



HAL
open science

L'insertion membranaire de la protéine pro-apoptotique Bax est un processus multi-étapes dépendant de TOM22

Akandé Rouchidane Eyitayo

► To cite this version:

Akandé Rouchidane Eyitayo. L'insertion membranaire de la protéine pro-apoptotique Bax est un processus multi-étapes dépendant de TOM22. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0353 . tel-04361118

HAL Id: tel-04361118

<https://theses.hal.science/tel-04361118v1>

Submitted on 22 Dec 2023

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.

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ BIOCHIMIE

Par Akandé ROUCHIDANE EYITAYO

**L'INSERTION MEMBRANAIRE DE LA PROTÉINE
PRO-APOPTOTIQUE BAX EST UN PROCESSUS MULTI-ÉTAPES
DÉPENDANT DE TOM22**

Sous la direction de : Stéphen MANON

Soutenue le 01/12/2023

Membres du jury :

M. BESSOULE, Jean-Jacques, Directeur de Recherches CNRS

Mme GUÉNAL, Isabelle, Professeure des Universités UVSQ

M. CHAPTAL, Vincent, Chargé de Recherches CNRS

Mme BERGDOLL, Lucie, Chargée de Recherches CNRS

Mme LALIER, Lisenn, Chargée de Recherches ICO

M. MANON, Stéphen, Directeur de Recherches CNRS

Président

Rapporteure

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Directeur de thèse

Membre invité :

Mme GONZALEZ, Cécile, Maîtresse de Conférences IUT Lyon1

Je dédie entièrement ce travail à la mémoire de mère Labitan Fatimath.
À mon père Sanni Moussiliou.
À mon grand frère Sanni Saka.
À tous mes frères et sœurs

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mmes Isabelle Guéna, Lucie Bergdoll et Lisenn Lalier, et Mrs Vincent Chaptal et Jean-Jacques Bessoule d'avoir accepté de juger ce travail.

J'ai réalisé tous mes travaux de recherche depuis le master I jusqu'en thèse dans l'équipe "Prima" à l'Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires (IBGC) à Bordeaux.

Durant ces cinq années à l'IBGC, j'ai eu la chance de côtoyer des personnes admirables qui ont participé de près ou de loin à la réussite de ce travail.

Je souhaite avant tout remercier mon directeur de thèse, Stéphane. Merci d'avoir été un tel soutien pour moi durant ces cinq dernières années, vous avez toute ma gratitude. Merci pour votre bienveillance, votre bonne humeur et votre patience. Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir laissé libre cours à mes idées d'explorations techniques. Merci de m'avoir transmis la passion pour la recherche fondamentale, je suis fier et orgueilleux d'avoir acquis la méthodologie scientifique du meilleur directeur de thèse qu'on puisse avoir. Merci également pour le temps incroyable que vous avez consacré à la correction de ce manuscrit malgré toutes les obligations qui vous accaparent.

À ma maîtresse de stage de master 1, Cécile, celle avec qui tout a commencé. Merci de m'avoir fait confiance et transmis les bases techniques de la biochimie. Pour développer ce projet, j'ai puisé dans les connaissances et les méthodologies d'analyses que tu m'as transmises. Je te remercie également pour le temps que tu m'as consacré pendant mon stage de master 1 malgré toutes tes obligations.

À Muriel (maman dragon), merci pour tous les précieux conseils et toutes les discussions qu'on a pu avoir. Merci pour l'aide incomparable et la patience dont tu as fait preuve pendant les multiples préparations à la valorisation de ce travail. Merci de m'avoir transmis les méthodologies fondamentales pour la valorisation et la présentation de mes travaux. Aujourd'hui encore je puis dans cette inspiration pour mes présentations. Merci également de m'avoir initié à la culture cellulaire. Merci d'avoir pris de ton temps pour la réussite de mon projet.

À Nadine, merci, pour tous les précieux conseils que vous m'avez prodigués durant ces cinq dernières années. Merci pour votre patience pendant les multiples préparations à la valorisation de ce travail. Merci d'avoir été là pour répondre à mes questions quand Stéphane n'était pas présent.

À Marie-France, merci pour tous vos précieux conseils et toutes les discussions de couloir que nous avons pu partager et qui m'ont été d'une grande inspiration. Merci de m'avoir formé à la préparation de l'extrait bactérien et d'avoir répondu à mes nombreuses interrogations sur le système «cell-free».

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les amis et collègues Axel et Joann qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel durant toutes ces années. Une attention particulière envers Axel mon collègue et ami depuis le premier jour, merci à toi pour tous les moments exceptionnels que nous avons partagés.

Merci à Stéphane Duvezin-Caubet pour tes conseils et pour m'avoir initié à la préparation des mitochondries ainsi qu'aux tests de respiration.

Merci à Laetitia Daury de m'avoir initié à la technique de la coloration négative, merci pour ta collaboration sur ce projet.

Merci à Stéphane Chaignepain pour la spectrométrie de masse. J'espère qu'on pourra faire l'HDX-MS un jour.

Merci à l'Agence Nationale des Bourses du Gabon (ANBG) pour avoir gracieusement financé mes études.

Sommaire

Sommaire

Introduction.....	5
I. La mort cellulaire : pourquoi? comment? Par quoi?.....	6
1. La nécrose.....	6
2. La mort avec autophagie.....	8
3. L'apoptose.....	9
3.1. Rôle pathophysiologique de l'apoptose.....	11
3.2. Mécanismes moléculaires de l'apoptose.....	13
3.2.1. Les caspases.....	14
3.2.2. La voie de signalisation extrinsèque de l'apoptose.....	17
3.2.3. La voie de signalisation intrinsèque de l'apoptose (voie mitochondriale).....	18
II. La mitochondrie.....	20
1. La mitochondrie dans la voie intrinsèque de l'apoptose.....	20
2. Les fonctions mitochondriales non liées à l'apoptose.....	21
2.1. Les oxydations phosphorylantes.....	22
2.2. Mécanismes d'import des protéines mitochondriales.....	24
2.2.1. Le complexe TOM.....	24
2.2.2. Le complexe TIM.....	26
2.2.3. Le complexe SAM.....	26
3. Les fonctions mitochondriales directement liées à l'apoptose.....	27
4. Les fonctions mitochondriales indirectement liées à l'apoptose.....	29
4.1. stockage de calcium et production de ROS.....	29
4.2. La dynamique mitochondriale.....	30
III. La famille de Bcl-2 : effecteurs de la voie mitochondriale de l'apoptose.....	32
1. Mise en évidence de l'importance des domaines BH pour la fonction des protéines de la famille de Bcl-2.....	32
2. Les membres anti-apoptotiques.....	35
3. Les membres pro-apoptotiques à mutidomaines BH.....	37
4. Les membres pro-apoptotiques à domaine BH3 seulement.....	38
5. Distribution des protéines de la famille de Bcl-2.....	40
6. Le Complexe TOM et les protéines de la famille de Bcl-2.....	41
IV. La protéine pro-apoptotique Bax.....	44
1. Présentation générale.....	44
2. Localisation subcellulaire de Bax.....	47
2.1. Propriétés de la conformation soluble de Bax.....	47
2.1.1. L'extrémité N-terminale : ART (Apoptotic Regulation of Targeting).....	47
2.1.2. L'extrémité C-terminale : implication de la stabilité de l'hélice $\alpha 9$ dans le sillon hydrophobe.....	49
2.1.3. Implication d'autres partenaires dans le maintien d'une forme soluble de Bax.....	50
2.2. Adressage de Bax à la mitochondrie.....	51
2.2.1. Changements conformationnels liés à l'activation de Bax.....	52
2.2.2. Oligomérisation et perméabilisation de la MOM.....	56
V. Démarche expérimentale.....	59
1. Le système de synthèse protéique «cell-free».....	59
2. Les nanodisques comme outils d'étude des protéines membranaires.....	63
Résultats.....	67
1ère Partie.....	68

I. Etude des changements conformationnels induits par l'interaction entre Bax et une bicouche lipidique.....	69
1. Contexte et historique.....	69
2. Démarche expérimentale.....	71
3. Bax WT et Bax P168A néosynthétisées ne s'insèrent pas spontanément dans les nanodisques.....	72
4. Les activateurs directs de Bax (BidBH3, BimBH3 et BTSA1) ne stimulent pas son insertion dans les nanodisques.....	74
5. La bicouche lipidique induit un changement conformationnel de Bax.....	77
6. Le domaine «GALLL» de l'hélice α 1 est directement impliqué dans la précipitation de Bax induite par la bicouche lipidique.....	80
7. Mise en évidence d'un second changement conformationnel de Bax induit par les nanodisques.....	83
8. Discussion du chapitre I.....	86
II. TOM22, partenaire indispensable pour l'insertion de Bax dans les nanodisques.....	92
1. Contexte.....	92
2. TOM22 prévient la précipitation de Bax et stimule son association avec les nanodisques.....	94
3. TOM22 stimule l'insertion de Bax dans la bicouche lipidique.....	99
4. TOM22 induit un changement conformationnel de Bax.....	101
5. Propriétés fonctionnelles de Bax inséré dans la membrane via le changement conformationnel induit par TOM22.....	103
6. Etude des mécanismes moléculaires régissant l'interaction entre Bax et TOM22.....	106
6.1. Initiation de l'interaction Bax/TOM22.....	107
6.2. TOM22 stimule l'insertion des hélices α 5 et α 9 de Bax dans les nanodisques.....	108
6.3. L'insertion de Bax dans les nanodisques est conduite par l'insertion de son hélice α 9 C-terminale.....	111
7. Identification des résidus impliqués dans l'interaction Bax/TOM22.....	114
7.1. Données préliminaires.....	114
7.2. La mutation de l'aspartate 154 (D154) empêche le changement conformationnel induit par TOM22.....	117
7.3. La mutation de l'arginine 9 (R9) de l'ART récapitule le changement conformationnel induit par TOM22.....	120
7.4. La mutation de la sérine 16 en alanine (S16A) abroge l'interaction Bax/TOM22.....	124
7.5. La mutation de l'alanine 24 (A24) du domaine «GALLL» de l'hélice α 1 abroge l'interaction Bax/TOM22.....	128
8. L'activation de Bax par TOM22 a-t-elle une pertinence pathophysiologique?.....	129
8.1. Les mutants à effet direct.....	130
8.2. Les mutants à effet indirect.....	131
8.3. Les mutants sans effet.....	132
9. Discussion du chapitre II.....	134
III. Bax et Bcl-xL s'insèrent dans les nanodisques sous-forme d'hétérodimère inactif.....	140
1. Contexte.....	140
2. Bcl-xL est spontanément insérée dans les nanodisques.....	141
3. L'insertion dans les nanodisques protège Bcl-xL contre la troncation de son hélice α C-terminale.....	143
4. Bcl-xL inséré dans les nanodisques n'est pas tronquée.....	145
5. Bcl-xL prévient la précipitation de Bax et stimule son insertion dans les nanodisques.....	147
6. Bax et Bcl-xL sont co-insérées dans les nanodisques.....	149
7. Bcl-xL prévient la précipitation de Bax en interagissant avec un domaine distinct du domaine «GALLL».....	151

8. L'hélice $\alpha 9$ de Bax n'est pas indispensable pour sa co-insertion avec Bcl-xL.....	154
9. Discussion du chapitre III.....	156
IV. Potentialisation de l'effet des BH3-mimétiques par TOM22.....	158
1. Contexte.....	158
2. Implication de Tom22 dans l'action des BH3-mimétiques.....	162
3. Discussion du chapitre III.....	166
2ème Partie.....	169
1. Contexte.....	170
2. Bax est précipitée en présence de nanodisques.....	172
3. Resolubilisation de Bax précipitée par des détergents.....	173
3.1. Conformation de Bax resolubilisé.....	173
3.2. Propriétés fonctionnelles de Bax resolubilisé.....	175
4. Co-formation des nanodisques contenant Bax.....	176
4.1. Observation des nanodisques co-formés avec Bax en microscopie électronique à transmission.....	180
4.2. Propriétés fonctionnelles de Bax resolubilisé en nanodisques.....	185
5. Discussion de la 2ème Partie.....	187
Conclusion générale et perspectives.....	195
Matériel et Méthodes.....	200
1. Construction des plasmides et génération des mutants.....	201
2. Synthèse et purification des protéines et des nanodisques.....	202
2.1. Synthèse de Bax en «Cell-free» en présence ou en absence de nanodisques.....	202
2.2. Préparation de l'extrait d' <i>E.coli</i> (S30) pour 1L de culture.....	203
2.3. Purification de la T7 ARN polymérase pour 1L de culture.....	204
2.4. Préparation des nanodisques.....	205
2.5. Co-formation des nanodisques contenant Bax WT ou Bax P168A.....	206
2.6. Reconstitution de HisBax WT et HisBax P168A dans les nanodisques par double purification.....	207
2.7. Purification de la protéine d'échafaudage des nanodisques (His7-MSP1E3D1).....	207
3. Analyses biochimiques.....	208
3.1. Traitements des nanodisques au carbonate de sodium.....	208
3.2. Test d'accessibilité au N-éthylmaleimide Polyéthylèneglycol (NEM-PEG).....	208
3.3. Immunoprécipitation et co-immunoprécipitation.....	209
3.4. Préparation des LUV et test de perméabilisation.....	209
3.5. Test de perméabilisation des LUV couplé à la synthèse en «cell-free».....	210
3.6. Test de dichroïsme circulaire.....	210
3.7. Dosage de protéines, SDS-PAGE et western blot.....	211
3.8. Purification de l'hétérodimère Bax/Bcl-xL et transfert de Bax.....	212
3.9. Analyse MALDI-MS.....	213
3.10. Isofocalisation électrique (IEF).....	214
3.11. Colorless Native PAGE (CN-PAGE).....	214
3.12. Microscopie électronique à transmission après coloration négative (TEM).....	214
3.13. Culture cellulaire et préparation de mitochondries isolées.....	215
3.14. Transfert de Bax et perméabilisation des mitochondries.....	215
4. Séquences des oligonucléotides.....	216
Bibliographie.....	219

Introduction

I. La mort cellulaire : pourquoi? comment? Par quoi?

Deux conceptions ont toujours accompagné l'observation de la mort d'une cellule «saine»:

L'une consistait à considérer la cellule comme une victime des perturbations de son environnement immédiat. Elle a d'ailleurs été appuyée par des résultats d'expériences consistant à exposer des cellules saines à un environnement létal. Par exemple, l'infection de la feuille de tabac par le pathogène *Pseudomonas syringae* s'accompagne d'une mort par nécrose rapide et localisée. Ainsi en isolant la zone contaminée, la plante évite une propagation du pathogène [1].

La seconde consistait à considérer cette mort comme étant un événement programmé essentiel pour le fonctionnement d'un organisme donné. Elle a été supportée notamment par des observations de plusieurs embryologistes qui ont noté que l'élimination ordonnée d'un certain nombre de cellules était nécessaire au développement normal de plusieurs organes.

Le concept de mort cellulaire programmée a été introduit en 1965 par Williams et Lockshin en étudiant des mécanismes de régulation endocrinienne chez le ver à soie [2]. En 1972, Kerr et al ont rapporté une mort cellulaire particulière observée dans des lobes de foie de rat soumis à l'ischémie. L'observation histologique de ce phénomène qui différait de la nécrose, mort cellulaire déjà connue, lui a d'abord valu le nom de « shrinkage necrosis » [3]. Ils décrivent ce processus comme étant complémentaire mais opposé à la mitose dans la régulation des populations de cellules animales.

Ainsi la conception selon laquelle la mort cellulaire pouvait être un événement programmé était soutenue pour la première fois par des données expérimentales.

Dans les années qui ont suivi, plusieurs autres formes de morts cellulaires programmées ou régulées ont été décrites. La nécrose, la mort avec autophagie et l'apoptose sont les trois formes de morts cellulaires les plus ubiquitaires. Après une brève description des deux premières, nous allons nous intéresser particulièrement à la mort cellulaire par apoptose.

1. La nécrose

La nécrose se définit comme la mort prématurée et non programmée d'une ou de plusieurs cellules. C'est la première forme de mort cellulaire décrite ; elle se produit lorsque la cellule est soumise à une agression physique ou chimique dont elle ne peut se remettre. Au niveau cytologique, elle est caractérisée d'un gonflement de la cellule et des organites, une dégradation de l'ADN, et une perte de l'intégrité de la membrane plasmique (**fig.1**).

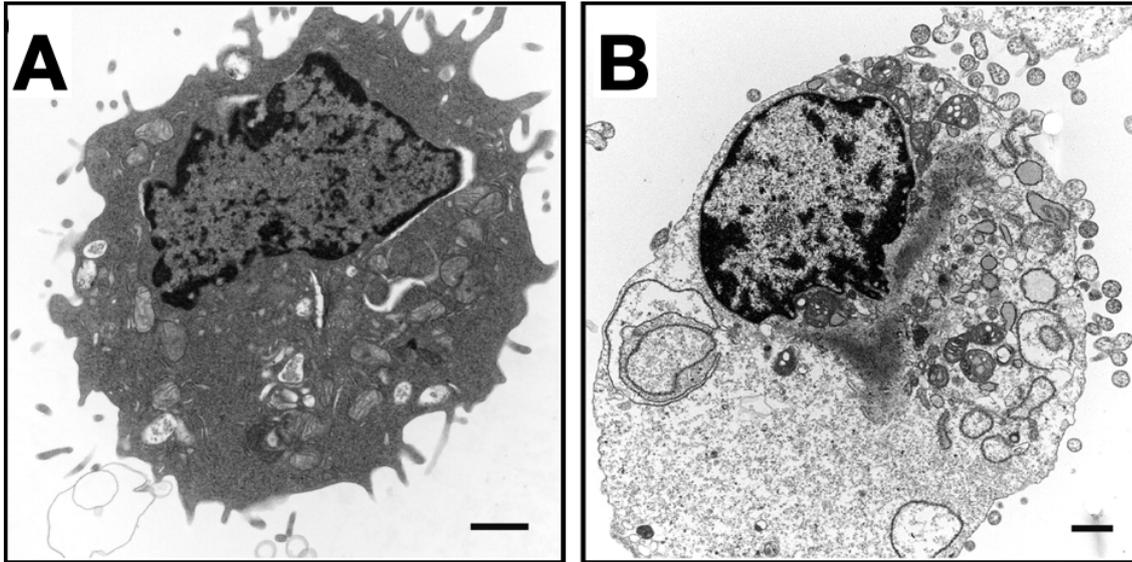


Figure 1 – Caractéristiques morphologiques des cellules nécrotiques

La barre d'échelle représente 1 μ M (A) cellule normale et (B) cellule nécrotique.

Images de microscopie électronique de Edinger et Thompson (2004), [4].

La rupture de la membrane plasmique déverse dans le milieu extracellulaire le contenu cytoplasmique entraînant un processus inflammatoire dans le tissu environnant.

On distingue donc la phase de nécrose, la phase inflammatoire puis la phase de réparation où les tissus sont transformés en tissus fibreux).

Il a été mis en évidence plus tard, une forme de nécrose régulée programmée Nécroptose. C'est une forme de mort programmée, mais dont les caractéristiques morphologiques sont similaires à celles de la nécrose. En effet, plusieurs études ont montré que la nécroptose pouvait être déclenchée par plusieurs stimuli physiologiques, notamment l'activation du récepteur de mort FAS [5] (pour revue). L'une des études pionnières qui ont mis en évidence le lien entre la nécrose et la machinerie moléculaire impliquée dans des formes de mort cellulaire programmée telles que l'apoptose est celle de Ray et al 1996. Ces auteurs ont infecté des cellules de foie de porc soit avec le virus de la variole de la vache de type sauvage soit avec une variante dépourvue du gène *crmA*, codant pour une protéine inhibitrice des caspases-1 et 8 (effecteur de l'apoptose). Ils ont observé que les cellules infectées par le virus modifié ne mourraient pas par nécrose, mais présentaient les caractéristiques morphologiques des cellules en apoptose [6]. Ceci suggère que le gène *crmA* est nécessaire pour inhiber les processus d'apoptose.

2. La mort avec autophagie

L'autophagie comme son nom l'indique est un processus d'auto-digestion qui consiste en une dégradation de composants intracellulaires par le lysosome chez les animaux ou la vacuole chez les plantes et les champignons. Ashford et al ont observé par microscopie électronique, la présence d'un nombre important de vésicules dans le foie de rat perfusé avec le glucagon (**fig 2**). La taille, et l'invagination du cytoplasme dans ces vésicules permettent de les distinguer des lysosomes [7]. Ces vésicules ont été nommées autophagosomes. Il a ensuite été montré que les autophagosomes sont formés d'une double membrane qui encapsule des portions du cytoplasme, permettant ainsi la dégradation des composants cellulaires par fusion avec les lysosomes. Chez la levure, *Dictyostelium*, *C. elegans* et les plantes, l'autophagie représente un mécanisme de survie utilisé pour permettre à ces organismes de survivre aux périodes de carence [8] (pour revue). Ce processus est très conservé chez tous les eucaryotes; chez les animaux, l'autophagie permet notamment la survie des souris pendant la période post-natale [9]. Elle est également nécessaire à la survie des cellules cancéreuses dans les tumeurs mal irriguées [10] (pour revue).

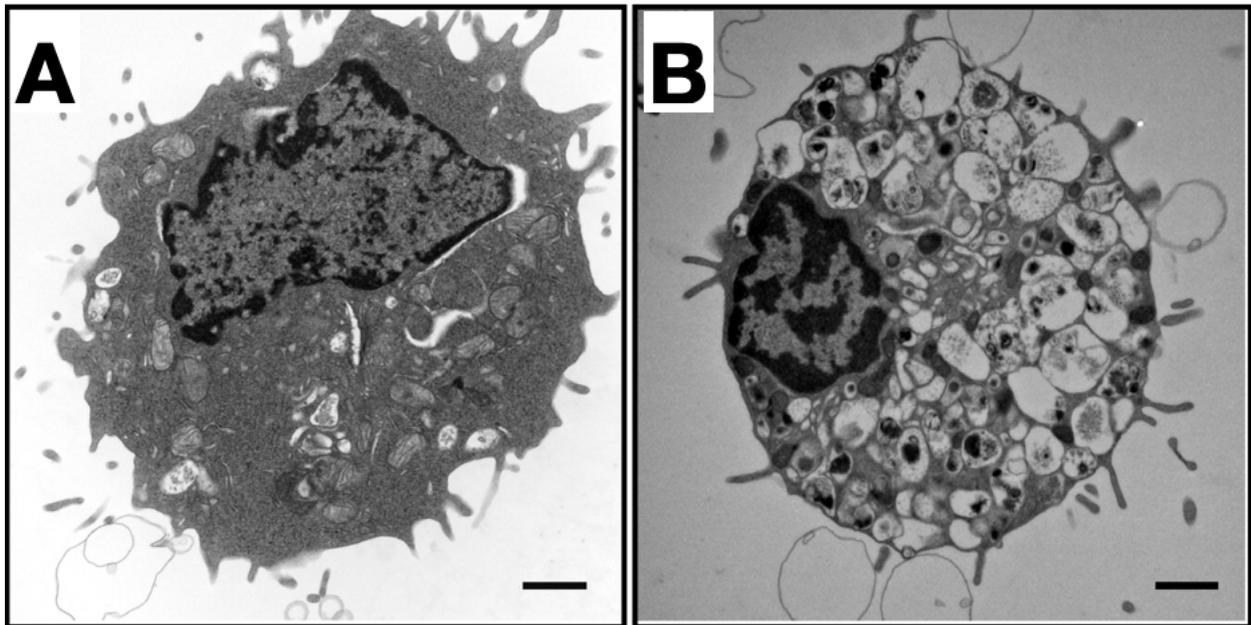


Figure 2 – Caractéristiques morphologiques des cellules autophagique

La barre d'échelle représente 1 μ M (A) cellule normale et (B) cellule autophagique. Images de microscopie électronique de Edinger et al, [4].

À l'inverse, Il a été montré que, dans les cellules de carcinome mammaire, la mort cellulaire programmée est accompagnée de la formation de vésicules autophagiques. De plus l'inhibition de la formation de ces vésicules s'accompagne de l'inhibition de la mort cellulaire, suggérant la mise en place d'une mort cellulaire autophagique [11]. En 1999, Liang et al ont identifié Beclin-1, une

protéine impliquée à la fois dans la stimulation de l'autophagie et la régulation de l'apoptose *via* son interaction avec les protéines anti-apoptotiques [12]. Ceci a conduit à proposer l'hypothèse qu'une stimulation de l'autophagie, pourrait compenser une apoptose déficiente [13] (pour revue).

D'autre part, l'autophagie peut dégrader sélectivement des protéines favorables à la survie, faisant ainsi pencher la balance de la vie à la mort. Par exemple, la ferritinophagie est une forme d'autophagie sélective entraînant la dégradation sélective de la ferritine (une protéine de stockage du fer), provoquant par conséquent une libération de fer et des lésions oxydatives qui aboutissent à la mort par ferroptose [14].

L'autophagie peut également participer aux fonctions cellulaires liées au développement [15], ou à l'élimination des corps étrangers [16] (pour revue). Les mécanismes qui sous-tendent cette participation de l'autophagie au processus de mort cellulaire programmée restent discutés.

3. L'apoptose

Les caractéristiques morphologiques des cellules en apoptose qui ont permis à Kerr et al de distinguer ce processus de mort cellulaire à la nécrose représentent une phase tardive du processus (fig 3) [3].

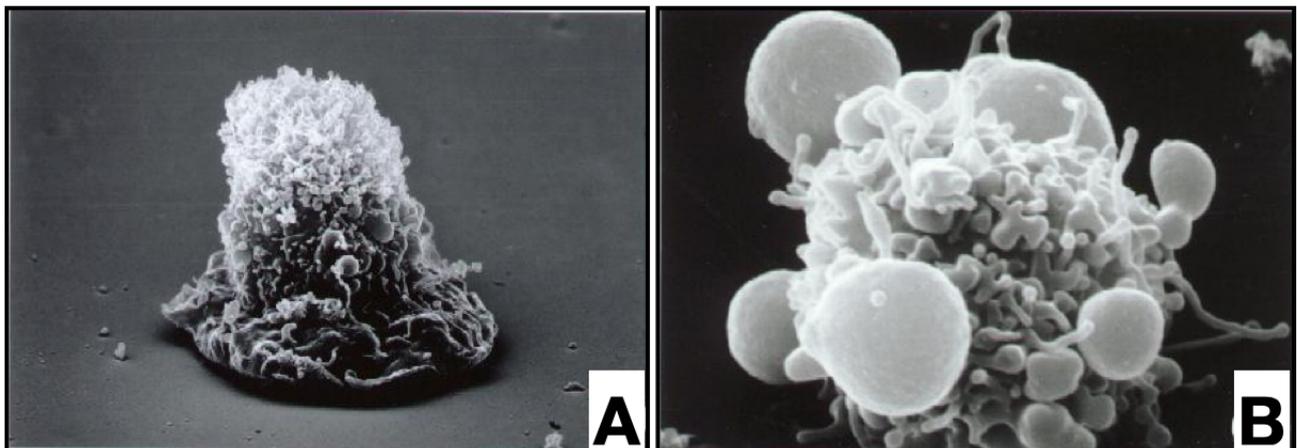


Figure 3 – Caractéristiques morphologiques des cellules épithéliales en apoptose

(A) : stade précoce de l'apoptose.

(B) : stade tardif, correspondant à la formation des corps apoptotiques. Les cellules en apoptose bourgeonnent en conservant l'intégrité de la membrane plasmique.

Images de microscopie électronique de Walter Malorni, Stefano Fais et Carla Fiorentini

http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto4/15_apop/data/malorni/malorni.htm

Ces auteurs avaient d'abord décrit deux étapes distinctes. La première comprend la condensation du noyau et du cytoplasme et la fragmentation de la cellule en un certain nombre de fragments qui

conservent l'intégrité de la membrane plasmique, nommés corps apoptotiques (**fig 3B et 4**). La deuxième étape, correspond à l'élimination des corps apoptotiques soit par les macrophages soit par endocytose par d'autres cellules, où ils subissent une série de changements ressemblant à une autolyse *in vitro* au sein des phagosomes, et sont rapidement dégradés par les enzymes lysosomales des cellules ingérées.

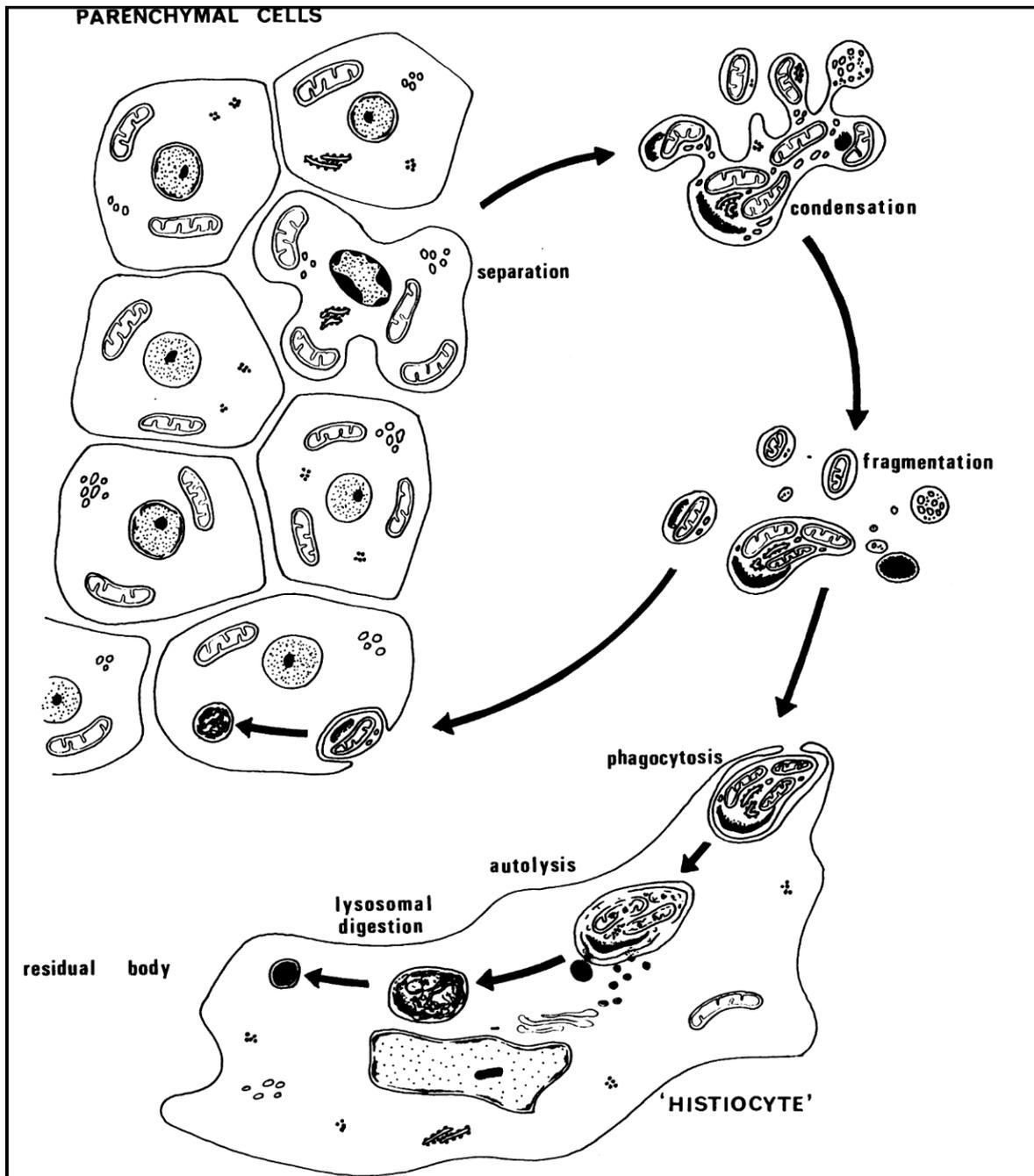


Figure 4 – Observation des étapes de l'apoptose dans un tissu épithéliale; Kerr et al 1972

Le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique par les corps apoptotiques permet d'éviter ces processus inflammatoires liés au déversement du cytoplasme dans l'environnement extracellulaire.

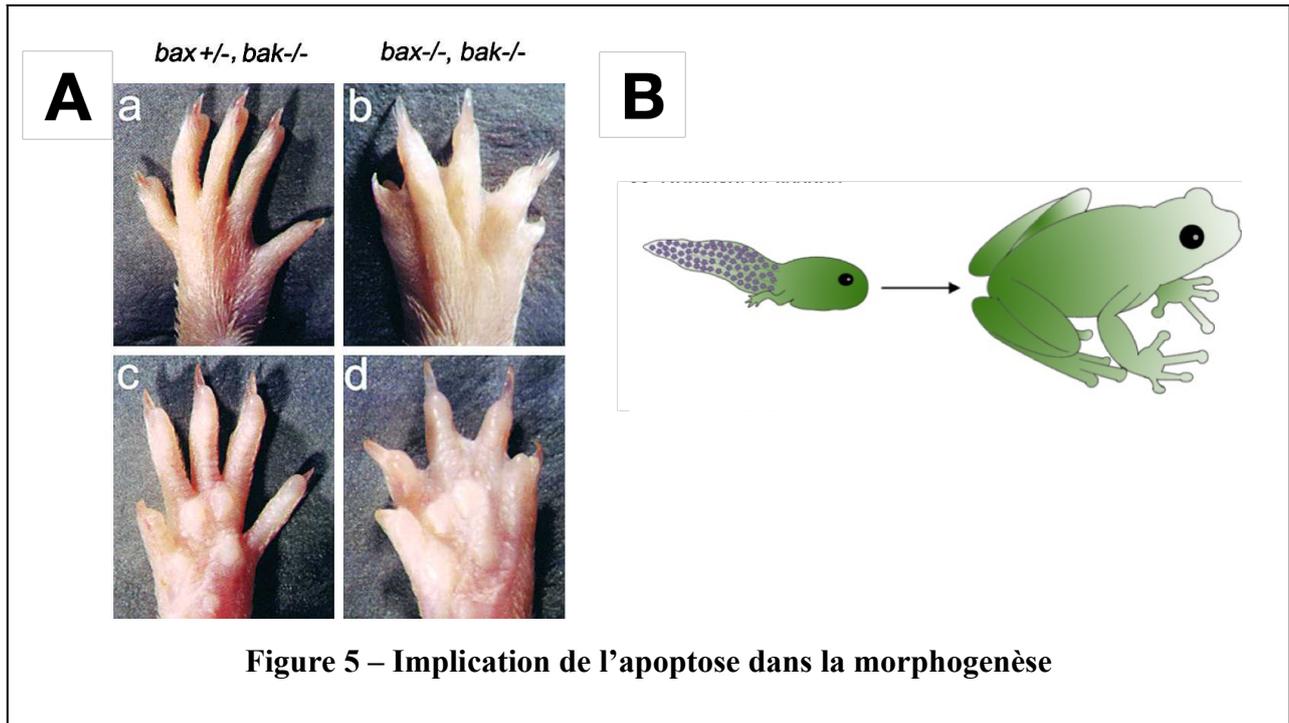
Bien que les observations de Kerr et al aient montré que les corps apoptotiques sont endocytés par les cellules environnantes, nombre d'études ont montré un caractère immunogène de l'apoptose [17]. En effet, il a été montré que la phosphatidyl-L-sérine, un phospholipide initialement localisé uniquement dans le feuillet interne de la membrane plasmique, est transloqué dans le feuillet externe. L'exposition de la phosphatidylsérine, permet la reconnaissance des corps apoptotiques par les macrophages. Pour preuve, la présence de liposomes composés de phosphatidylsérine permet d'inhiber la reconnaissance des corps apoptotiques [18].

Une autre caractéristique très importante de l'apoptose est le maintien de la capacité des cellules à produire de l'ATP jusqu'à la dernière phase du processus. En effet, Leist et al ont observé que lorsque l'ATP est déplété dans des cellules T humaines en état apoptotique, l'apoptose est avortée et les cellules meurent par nécrose. De plus la restauration du niveau d'ATP dans des cellules traitées avec des inducteurs d'apoptose, rétablit la capacité des cellules à subir l'apoptose et empêche la nécrose [19]. Ces données montrent que l'ATP est nécessaire à la progression de l'apoptose.

3.1. Rôle pathophysiologique de l'apoptose

Grâce à leurs observations sur le fait que l'élimination ordonnée d'un certain nombre de cellules était nécessaire au développement normal de plusieurs organes, les embryologistes soutenaient déjà l'hypothèse de la participation de la mort cellulaire programmée dans le développement bien avant la mise en évidence de l'apoptose. Contrairement à la nécrose, l'apoptose n'entraîne pas de processus inflammatoires, les cellules environnantes ne sont donc pas dangereusement affectées par leurs voisines mourantes. On comprend donc que l'apoptose soit adaptée à la morphogenèse et au remodelage tissulaire.

L'un des exemples les plus évidents de l'implication de l'apoptose dans la morphogenèse est la formation de doigts chez les vertébrés supérieurs. Lindsten et al ont observé que la délétion de deux protéines pro-apoptotiques (Bax et Bak) entraîne un défaut dans l'individualisation des doigts qui se produit chez de nombreux animaux par la suppression des réseaux interdigitaux (**fig 5A**) [20]. Ceci montre que l'apoptose joue un rôle dans la sculpture des tissus et organes au cours du développement.



Au cours du développement, plusieurs tissus dont la fonction était transitoire sont supprimés lorsqu'elles ne sont plus nécessaires par des formes de mort programmée dont l'apoptose.

Un exemple est l'élimination de la queue du têtard lors de sa métamorphose en grenouille qui implique une apoptose massive (**fig 5B**) [21].

L'équilibre complexe entre la division cellulaire et la mort programmée des cellules permet aux organes et aux tissus d'atteindre un nombre de cellules approprié; ceci représente un point important pour leurs développements. Par exemple durant le développement, les neurones sont surproduits puis subissent un contrôle qualité. Les neurones capables de se connecter au réseau neuronal reçoivent un signal de survie *via* ce réseau; les autres seront éliminés par des processus de mort cellulaire programmée [22] (pour revue). White et al ont mis évidence le rôle de l'apoptose dans ce processus. Ils ont observé que des souris KO pour Bax possèdent jusqu'à 35% de neurones et axones en plus par rapport aux souris de type sauvage. De plus, ils ont observé que ces neurones surnuméraires possèdent des sections transversales plus petites que la moyenne, suggérant qu'ils ne sont pas fonctionnels [23].

Ainsi, l'homéostasie de l'organisme se joue entre la multiplication et la mort cellulaire. Un dysfonctionnement dans la régulation de l'apoptose pourrait donc entraîner diverses maladies,

notamment le cancer (lié à la régulation à la baisse) et des troubles neurodégénératifs (lié à la régulation à la hausse).

Par exemple, dans certains cancers il a été observé une perte de gènes codants pour les protéines pro-apoptotiques, et à l'inverse, une amplification ou une surexpression des protéines anti-apoptotiques [24] (pour revue).

Réciproquement, dans la sclérose en plaques, on observe une sous-expression des protéines anti-apoptotiques et une sur-expression des protéines pro-apoptotiques [25], [26].

3.2. Mécanismes moléculaires de l'apoptose

Les caractéristiques morphologiques des cellules apoptotiques décrites par Kerr et al en 1972 sont en fait les états les plus tardifs du processus de l'apoptose. Depuis, plusieurs études ont permis d'élucider les mécanismes moléculaires menant à ces caractéristiques. Une avancée considérable dans ce sens a été réalisée lorsque le développement complet du nématode *Caenorhabditis elegans* a été décrit. *Caenorhabditis elegans* est un ver transparent qui possède 1090 cellules, dont 131 subissent une forme de mort programmée dont les caractéristiques morphologiques sont comparables à celle de l'apoptose [27].

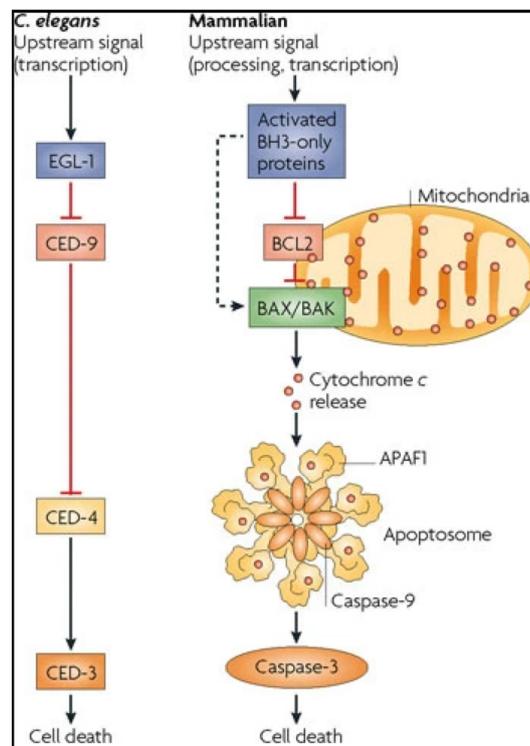


Figure 6 – mécanismes de l'apoptose chez *C. elegans* comparé aux mammifères [28]

La génétique a permis d'élucider les mécanismes qui sous-tendent le processus apoptotique chez *C. elegans*. Ces derniers se déroulent suivant une cascade de réactions dont le dernier effecteur est CED-3 dont l'homologue est la caspase-3 chez les mammifères. CED-3 est une protéase qui est présente dans la cellule sous une forme inactive. Son activation est médiée par CED-4 dont l'homologue chez les mammifères est la protéine adaptatrice Apaf-1. CED-4 est maintenue inactif par CED-9 (homologue de Bcl-2 chez les mammifères), qui lui est maintenue inactif par EGL-1 (homologue des protéines à BH3 seulement chez les mammifères) (**fig 6**).

La description du mécanisme moléculaire de l'apoptose chez *C. elegans* a été un événement important dans la compréhension de ces mécanismes moléculaires chez l'homme. En effet, Hengartner et al ont montré que le gène CED-9 code pour une protéine qui partage une homologie de séquence avec la protéine mammalienne Bcl-2 impliquée dans la survie cellulaire. De plus, le remplacement de CED-9 par Bcl-2 entraîne les mêmes effets protecteurs contre la mort cellulaire programmée chez *C. elegans*. Ces résultats suggèrent que CED-9 et Bcl-2 sont des homologues, mais aussi que les mécanismes de mort cellulaire programmée sont conservés entre les nématodes et les mammifères [29].

Une différence importante entre le nématode et les mammifères est l'implication de la mitochondrie *via* l'action des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak qui n'ont pas d'homologues chez le nématode (**fig 6**).

3.2.1. Les caspases

Le déterminant moléculaire central et commun aux processus d'apoptose est l'activation des caspases.

Les caspases (cystéines aspartyl proteases) sont une famille de protéases impliquée dans la régulation et l'exécution de l'apoptose. Elles possèdent une cystéine dans leur site actif qui leur confère leur activité catalytique. L'environnement de cette cystéine (QACXG; X = R, Q, D) permet la reconnaissance d'une séquence consensus de quatre résidus au niveau de leurs substrats; le clivage se fait du côté C-terminal de l'aspartyl en position quatre de cette séquence consensus [30].

Comme pour la plupart des protéases, les caspases sont exprimées dans les cellules sous forme inactive (zymogènes) nommée pro-caspases. Ces dernières possèdent un domaine nommé pro-domaine responsable de l'état inactif et deux autres domaines (conservés) impliqués dans l'activité catalytique. Il existe deux types de pro-domaines : le domaine DED (Death Effector Domain)

permet la reconnaissance des caspases par des récepteurs de mort, et le domaine CARD (Caspase-recruitment Domain) peut permettre la reconnaissance d'autres protéines incluant d'autres caspases. Ces différents domaines permettent de classer les caspases en trois groupes correspondant à trois types de fonctions (**fig 7**) :

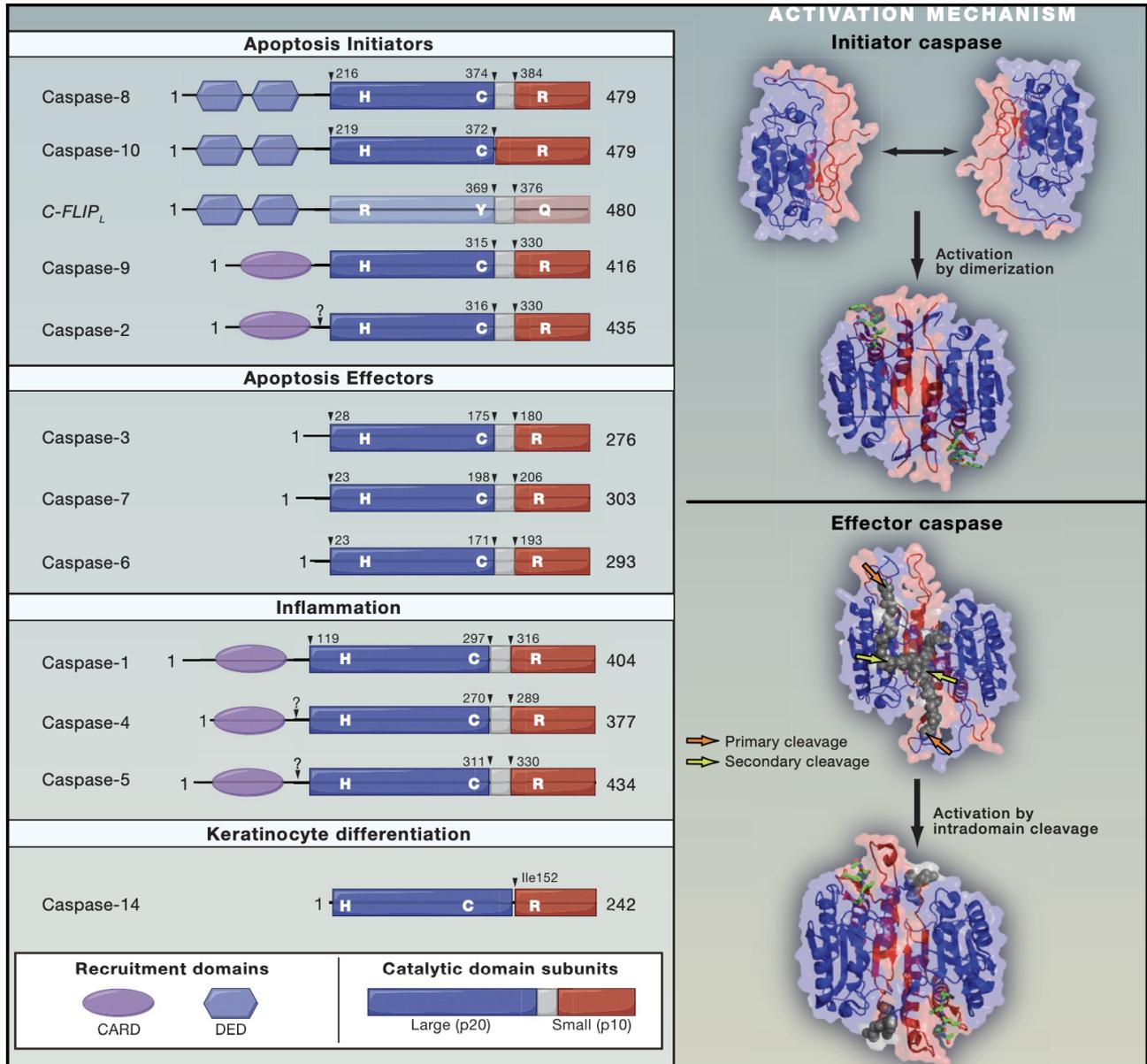


Figure 7 – Structure des caspases [31]

- Les caspases initiatrices : caspases 8, 9, et 10 comprennent un long pro-domaine. Elles sont activées par les récepteurs de mort (*via* le domaine DED) ou par Apaf-1. Elles agissent en amont en activant directement ou indirectement les caspases effectrices.
- Les caspases effectrices : caspases 3, 7 et 6 qui partagent un pro-domaine court similaire et sont classiquement décrites comme les exécuteurs de l'apoptose.

Les caspases initiatrices et effectrices forment la catégorie des caspases proapoptotiques.. Leurs actions concertées entraînent une cascade pour cliver un certain nombre de protéines cellulaires, conduisant finalement à la mort de la cellule.

-Les autres caspases non impliquées dans l'apoptose : 1, 4 et 5 (impliqué dans l'inflammation) et la caspase 14 (impliqués dans la différenciation des kératinocytes).

Les mécanismes d'activations des caspases passent par une étape de dimérisation (forme active). Les caspases initiatrices sont monomériques à l'état zymogènes et dimérisent suite à différents stimuli en général non protéolytiques (**fig 7 côté droit**).

À l'inverse, les caspases effectrices sont déjà dimériques et subissent un clivage protéolytique dans la région catalytique (**fig 7 côté droit**).

Le clivage activateur génère une chaîne longue (p20) et une chaîne courte (p10), la forme active finale est un hétérotétramère formé de deux p20 et deux p10.

En fonction du mécanisme d'activation des caspases effectrices, on distingue deux voies de signalisation de l'apoptose chez les mammifères. La voie extrinsèque implique l'activation des caspases initiatrices par les récepteurs de mort, alors que la voie intrinsèque implique des facteurs relargués depuis la mitochondrie.

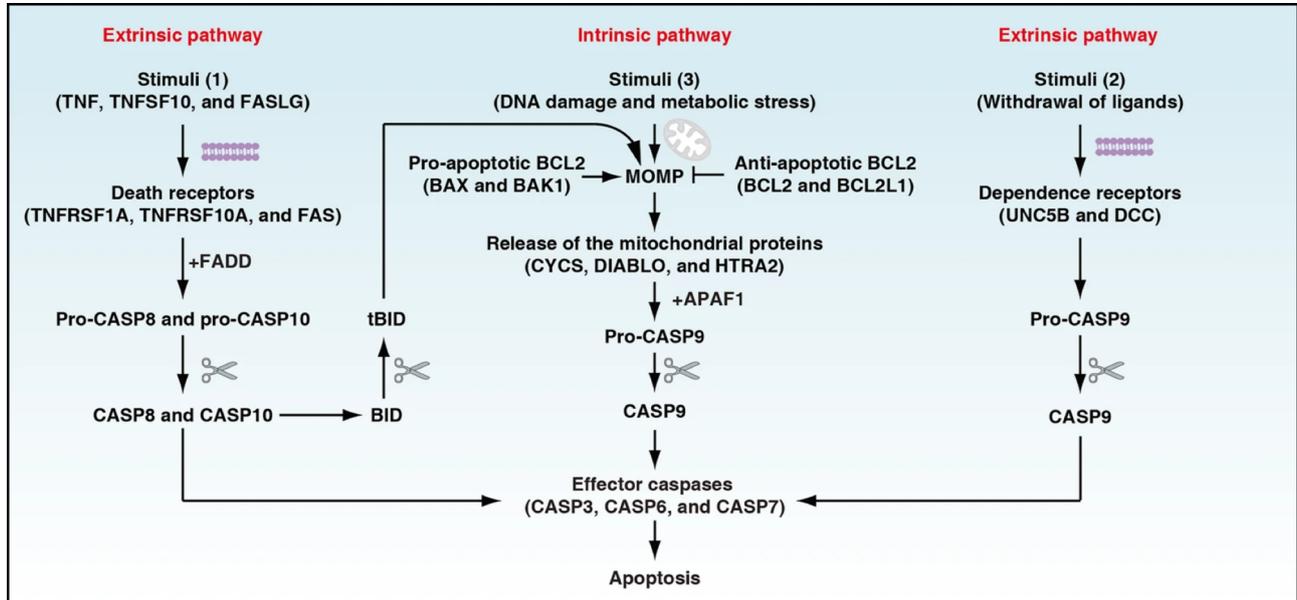


Figure 8 – Les voies de signalisation de l'apoptose [5]

3.2.2. La voie de signalisation extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque de l'apoptose est initiée par des perturbations du micro-environnement extracellulaire. Elle peut être déclenchée soit par ajout des ligands des récepteurs de mort (**fig 8**), soit par retrait de ligands des récepteurs de dépendance (récepteurs dont l'activation est dépendante d'une concentration donnée de son ligand) (**fig 8**).

Les récepteurs de mort font partie de la famille des récepteurs des cytokines de la famille TNF (Tumor Necrosis Factor), parmi lesquels, le membre A1 de la superfamille des récepteurs du TNF (TNFRSF1A ; mieux connu sous le nom de TNFR1). L'une des principales caractéristiques de ces récepteurs est la présence d'un domaine d'homologie situé du côté intracellulaire appelée domaine de mort DD (Death Domaine). Ce dernier est nécessaire à la transmission du signal cytotoxique. Cinq types de récepteurs de mort différents ont été décrits y compris le récepteur du TNF- α (TNF-R). Les voies de signalisation par lesquelles ces récepteurs induisent l'apoptose sont assez similaires.

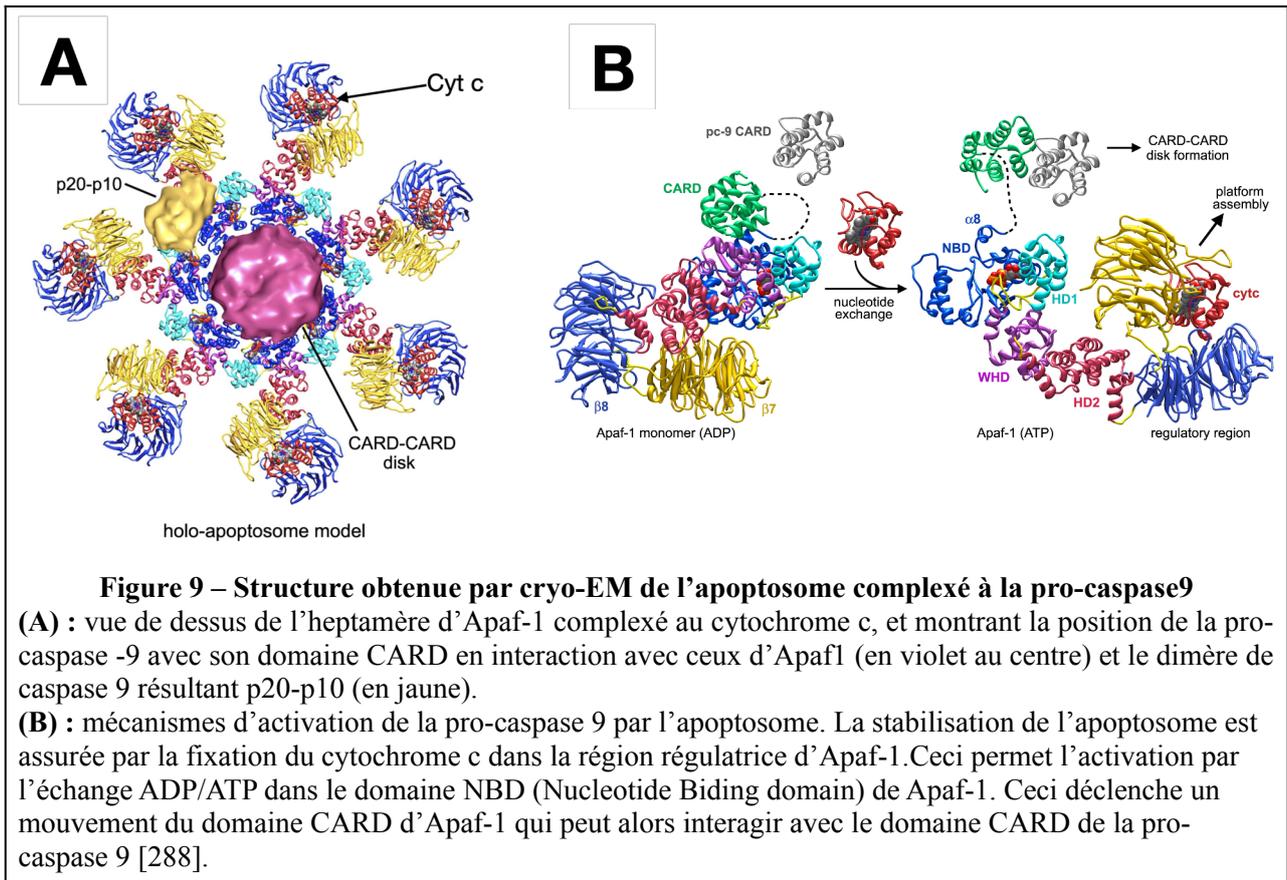
Lorsqu'un ligand se lie au récepteur, il induit une oligomérisation de ce dernier. Il s'ensuit le recrutement d'une protéine adaptatrice. La protéine adaptatrice possède un domaine homologue permettant son interaction avec les domaines intracellulaires des récepteurs, et un domaine lui permettant à son tour de recruter une protéine de transduction du signal (kinases, caspases). Ainsi, en se liant à une caspase proximale *via* son domaine DED, la protéine adaptatrice permet son activation, reliant ainsi la signalisation du récepteur à la machinerie des effecteurs apoptotiques. En général, la voie extrinsèque initie l'apoptose *via* l'activation des caspases initiatrices telles que les caspases 8 et 10.

Notons que les voies extrinsèques et intrinsèques ne sont pas complètement indépendantes, car la caspase 8 activée par les voies extrinsèques peuvent cliver la protéine Bid, qui initie ensuite l'apoptose par la voie mitochondriale (ou voie intrinsèque) (**fig 8**).

3.2.3. La voie de signalisation intrinsèque de l'apoptose (voie mitochondriale)

A l'inverse de la voie extrinsèque, la voie mitochondriale est initiée par des perturbations internes à la cellule telles que le retrait des facteurs de croissance, les dommages à l'ADN, le stress du réticulum endoplasmique (RE), la surcharge des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

La caspase initiatrice impliquée dans cette voie est la caspase 9; elle est activée par un complexe appelé apoptosome.



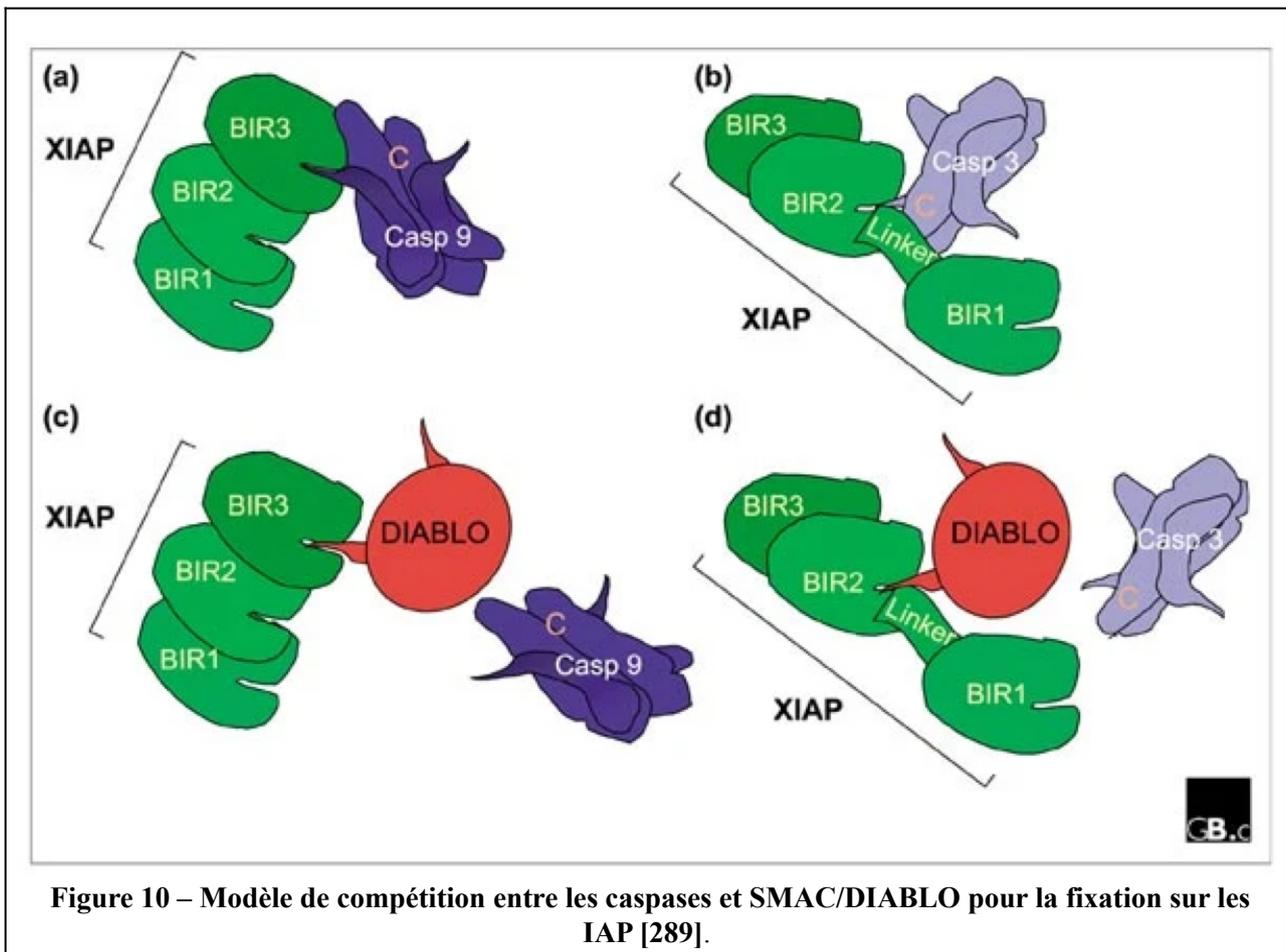
L'apoptosome est formé d'un heptamère de la protéine adaptatrice Apaf-1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor-1) stabilisé par le cytochrome c (**fig 9A**). Le cytochrome c est une hémoprotéine (protéine capable de lier l'hème) soluble dans l'espace inter-membranaire mitochondrial.

Li et al ont rapporté qu'une fois relargué dans le cytosol, le cytochrome c se lie à APAF-1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1). L'apoptosome ainsi formé peut alors échanger l'ADP pour l'ATP (ou dADP pour dATP), ce qui permet la fixation et le clivage de la pro-caspase 9 en caspase 9 (**fig 9B**). Une fois activée, la caspase 9 se dissocie de l'apoptosome et va à son tour activer les caspases effectrices telles que la caspase 3 [32]. La cascade d'activation de caspases qui s'ensuit entraîne la mort cellulaire par apoptose caspase dépendante [33] (pour revue).

Dans les cellules cancéreuses, le clivage des caspases effectrices précédemment décrit ne conduit pas toujours à leur activation. Ceci est dû à la surexpression d'inhibiteur de caspases appelé IAP (Inhibitor of Apoptosis) .

Les IAP sont une famille de protéines dont l'action pro-survie passe par l'inhibition directe des caspases (principalement les caspases 3 et 9) (**fig 10**). Elles agissent en se fixant sur les caspases actives et en induisant leur ubiquitinylation et par conséquent leur dégradation par le protéasome [34], [35] (pour revue).

Ce processus de dégradation des caspases peut être lui-même inhibé par une protéine relarguée depuis les mitochondries au cours de l'apoptose, nommée SMAC/DIABLO [36] et [34].



Cette protéine se lie aux IAP, empêchant ainsi la fixation des caspases 3 et 9 ce qui les protège contre la dégradation par le protéasome (**fig 10**).

II. La mitochondrie

1. La mitochondrie dans la voie intrinsèque de l'apoptose

Nous avons vu précédemment qu'une différence majeure entre les mécanismes de l'apoptose du nématode et des mammifères est l'implication de la mitochondrie. Par ailleurs deux protéines relarguées depuis la mitochondrie (cytochrome c et SMAC/DIABLO) sont directement impliquées dans l'activation des caspases. Nous allons donc nous intéresser au rôle de la mitochondrie dans l'apoptose. Après une présentation générale des principales fonctions mitochondriales, nous décrirons les mécanismes impliquant les mitochondries dans l'apoptose, notamment ceux à l'origine du relargage du cytochrome c, de SMAC/DIABLO et d'autres facteurs apoptogènes.

2. Les fonctions mitochondriales non liées à l'apoptose

Les mitochondries sont des organites semi-autonomes de la cellule eucaryote (à l'exception des érythrocytes). La théorie endosymbiotique stipule qu'elles proviennent de l'incorporation (par endocytose) par certaines archées, des organismes procaryotes avec lesquelles elles auraient entretenu une relation endosymbiotique [37]. Les mitochondries sont des organites de plusieurs centaines de nanomètres à quelques micromètres qui contiennent leur propre ADN (16 569 paires de bases chez l'espèce humaine et de 200 000 à 2 500 000 paires de bases chez les plantes) [38]. Selon les cellules et les conditions physiologiques, les mitochondries peuvent présenter des formes diverses. Elles sont formées de deux membranes qui délimitent trois compartiments aqueux :

-La membrane externe sépare l'espace inter-membranaire du cytosol. Grâce à la présence de porines (VDAC), elle présente une perméabilité limitée à des molécules d'environ 1,5kDa (par exemple, ADP et ATP) [39].

-La membrane interne, séparant l'espace inter-membranaire de la matrice mitochondriale. Elle est repliée de telle façon à créer de nombreuses invaginations (crêtes mitochondriales) qui augmentent la surface de la membrane sans accroître le volume de la mitochondrie. C'est sur cette membrane que sont localisés les complexes des oxydations phosphorylantes (chaîne respiratoire, ATP synthase et transporteurs associés).

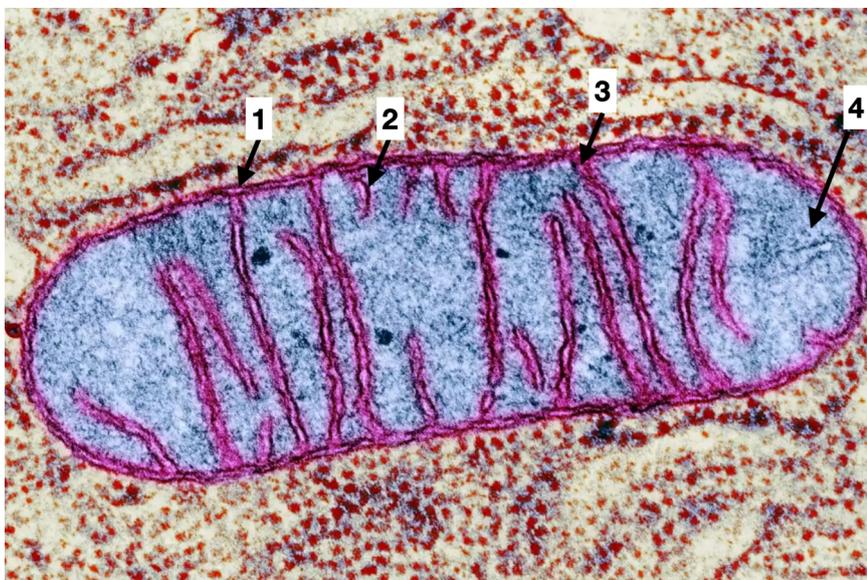


Figure 11 – schéma de la structure mitochondriale

- 1:** membrane externe,
- 2:** membrane interne,
- 3:** espace inter-membranaire,
- 4:** matrice.

Image de CNRI/Science Photo Library/Getty Images.

2.1. Les oxydations phosphorylantes

Les mitochondries sont généralement décrites comme la centrale énergétique de la cellule. En effet, leurs membranes internes sont le siège des oxydations phosphorylantes (OXPHOS) qui aboutit à la production d'ATP couplée à l'oxydation des substrats.

Les oxydations phosphorylantes permettent la production de l'ATP couplée à la réoxydation des coenzymes NADH et FADH₂. La réduction de ces coenzymes a lieu dans la matrice mitochondriale et permet de stocker sous forme chimique l'énergie issue de l'oxydation de l'acétyl coenzyme A par le cycle de Krebs (**fig 12**).

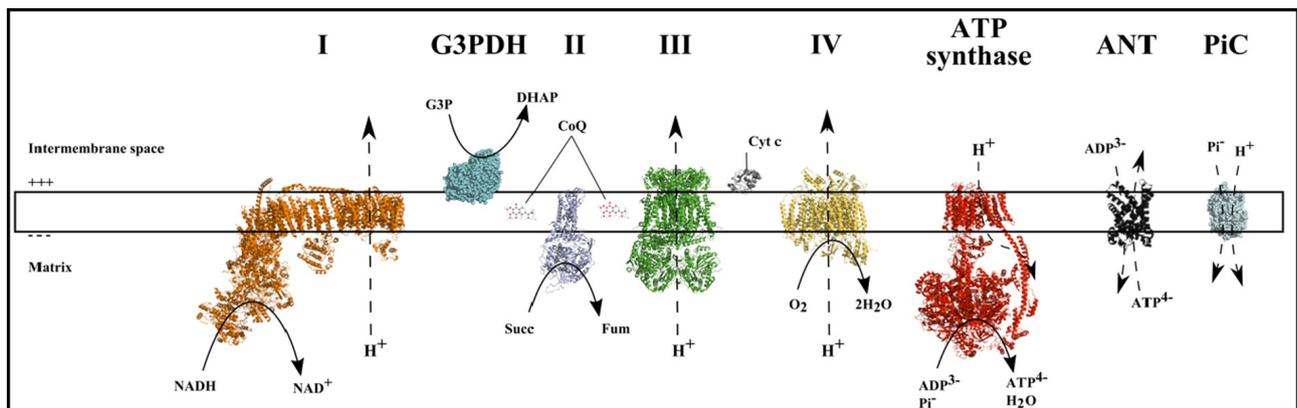


Figure 12 – Les complexes des oxydations phosphorylantes [40]

La chaîne est constituée de quatre complexes de transport d'électrons et de l'ATP synthase. Le coenzyme Q (ubiquinone) et le cytochrome c sont également impliqués dans la respiration mitochondriale, servant de "navettes d'électrons" ou de transporteurs d'électrons mobiles entre les complexes. Le coenzyme Q transporte les électrons entre les complexes I et III et I et II. Le cytochrome c les transporte entre les complexes III et IV. Le NADH transfère les électrons au complexe I et le FADH₂ au complexe II.

Ces coenzymes réduits sont ensuite réoxydés par les différents complexes de la chaîne respiratoire. Les électrons donnés par le NADH au complexe I ou par le FADH₂ au complexe II sont transmis au coenzyme Q. Les électrons passent ensuite du coenzyme Q au complexe III qui les transfère au cytochrome c. Du cytochrome c, les électrons passent au complexe IV et sont enfin transférés au dernier accepteur, l'oxygène (O₂) qui est réduit en H₂O [41]. Lorsque les électrons passent par ces complexes dans une série de réactions d'oxydo-réduction, l'énergie libérée par cette chaîne de transport d'électrons est utilisée pour pomper les protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire par l'intermédiaire des complexes I, III et IV, créant ainsi le gradient électrochimique ou force proto-motrice ($\Delta\Psi$ et ΔpH). Le gradient électrochimique permet aux protons de retourner dans la matrice à travers la partie membranaire du complexe V (ATP synthase), en utilisant l'énergie libérée pour catalyser la phosphorylation de l'ADP en ATP. Le gradient est

aussi utilisé par les deux transporteurs associés à l'ATP synthase (transporteur de phosphate et échangeur ADP/ATP) [40].

Par ailleurs, les mitochondries sont impliquées dans plusieurs voies métaboliques : cycle de Krebs, bêta-oxydation des acides gras, synthèses des hèmes et des stéroïdes hormonaux, synthèse de certains aminoacides, cycle de l'urée, etc.

2.2. Mécanismes d'import des protéines mitochondriales

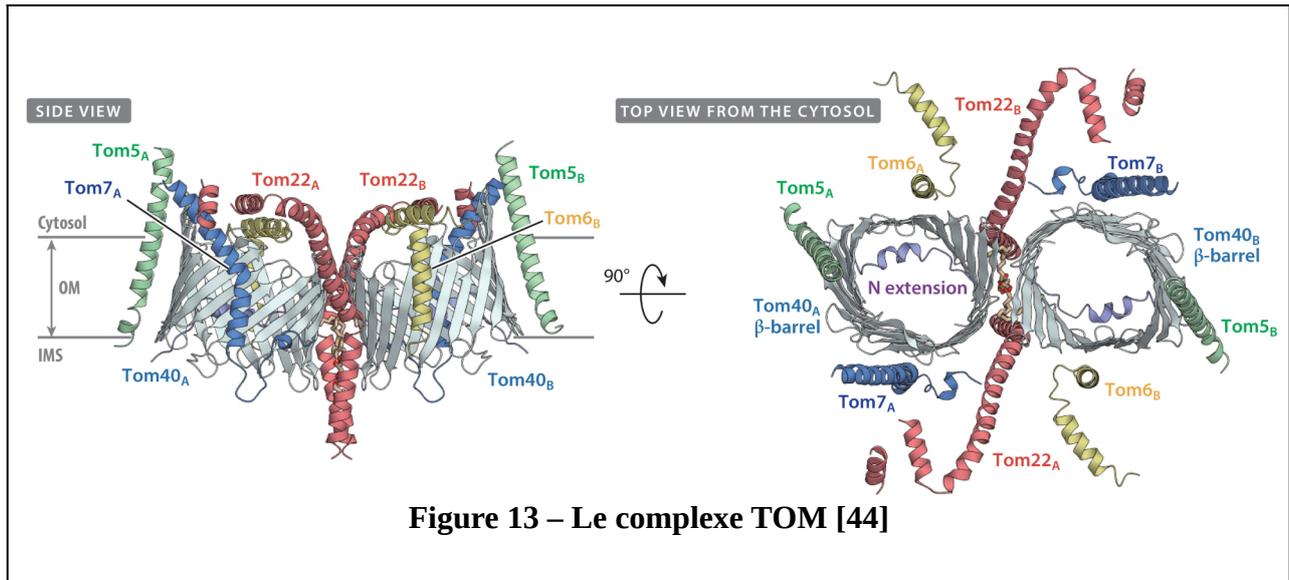
Le protéome mitochondrial (ensemble des protéines de la mitochondrie) est composé des protéines codées par le génome nucléaire et traduites dans le cytosol et des protéines codées par le génome mitochondrial et traduites dans la matrice. Plus de 99% du protéome est produit dans le cytosol, seules quelques sous-unités de l'ATP synthase et des complexes I, III et IV sont produites dans la matrice. Il y a donc nécessité d'importation des protéines mitochondriales d'origine cytosolique vers la mitochondrie. La membrane externe étant imperméable aux molécules de plus de 1,5kDa, l'import de ces protéines du cytosol vers la mitochondrie se fait *via* plusieurs complexes qui sont impliqués dans l'import, le tri et l'assemblage de ces protéines.

2.2.1. Le complexe TOM

Le complexe TOM (Translocase of the Outer Membrane) localisé dans la membrane externe et le complexe TIM (Translocase of the Inner Membrane) localisé dans la membrane interne fonctionnent de façon concertée. Les précurseurs cytosoliques des protéines mitochondriales contiennent des informations nécessaires et suffisantes pour les diriger vers les mitochondries. Dans la plupart des cas, ces informations sont présentes sous la forme d'une séquence clivable à l'extrémité N-terminale, également appelée préséquence ou prépeptide. Cependant, de nombreux précurseurs sont dépourvus de telles séquences clivables et contiennent à la place des signaux de ciblage internes [42] (pour revue).

Les premières structures à basse résolution de TOM de levure ont suggéré une organisation majoritairement en trimères et quelques dimères. De plus la délétion de TOM20 entraîne une organisation quasi totale en dimères [43].

Plus récemment, des structures à haute résolution ont été obtenues pour les complexes de *S.cerevisiae*, *N.crassa* et humain [44] (pour revue). Ces structures ne contiennent pas TOM20 et sont dimériques. La figure 13 représente la structure du complexe TOM humain élucidée par Cryo-microscopie électronique [45]. La sous-unité TOM40 forme le canal par lequel passent les protéines dépliées. Les deux sous-unités TOM40 sont structurées en tonneau β et reliées par deux sous-unités réceptrices Tom22 et un phospholipide (**fig 13**).



Des données d'électrophysiologie ont montré que le canal formé par TOM40 fait environ 2,5nm de diamètre [46]. Les sous-unités TOM20, TOM22 et TOM70 jouent un rôle de récepteurs qui vont reconnaître les préséquences de ciblage des protéines destinées à la mitochondrie. TOM20 et TOM22 reconnaissent les préséquences clivables, et TOM70 principalement les séquences non-clivables (séquence interne). En général, les préséquences clivables sont dans un premier temps reconnues par TOM20, puis transférées vers TOM22. Les sous-unités TOM5, TOM6, et TOM7 sont des régulateurs impliqués dans la stabilité et la dynamique du complexe [42] (pour revue).

La sous-unité TOM22, en plus d'être le récepteur central du complexe, participe également à la stabilité et à l'assemblage du complexe en liant les deux sous-unité TOM40 via son domaine transmembranaire. Il est structuré en hélice α transmembranaire amphipathique encadrée par les deux domaines hydrophiles localisés dans le cytosol et dans l'espace inter-membranaire (**fig 13 côté gauche**).

Les protéines importées étant sous forme de chaîne polypeptidique non structurée, elles peuvent donc être sujettes à la dégradation et à l'agrégation. Les protéines chaperonnes cytosoliques tels que Hsp70 et Hsp90 ont été montrées comme étant des facteurs qui vont complexer ces protéines afin de les stabiliser [47].

Yano et al ont montré qu'en plus de leurs rôles de récepteurs pour les séquences des protéines de ciblage à la mitochondrie, les domaines cytosoliques de TOM20 et TOM22 sont capables également de lier d'autres domaines que la séquence de ciblage. C'est par exemple le cas pour la Citrate Synthase, dont la liaison avec TOM22 prévient son agrégation. Ils en ont conclu que les domaines

cytosoliques de TOM20 et TOM22 jouent un rôle de chaperons qui permet de maintenir les protéines dans leur état déplié et les empêche de s'agréger à la surface de la mitochondrie [48].

2.2.2. Le complexe TIM

Le complexe TIM est la principale translocase préprotéique de la membrane interne des mitochondries. Il existe deux complexes TIM distincts :

-Le complexe TIM23; il participe à l'importation de tous les précurseurs des protéines de la matrice, la plupart des protéines de la membrane interne et de nombreuses protéines de l'espace inter-membranaire. Ce processus nécessite de l'énergie qui est fournie par le potentiel électrique membranaire à travers la membrane interne ($\Delta\psi$) et l'hydrolyse de l'ATP [47]. Les sous-unités du complexe TIM sont fonctionnellement classées en deux groupes: les sous-unités qui forment le canal conducteur des protéines (TIM50, TIM23, TIM17 et TIM21) et les sous-unités qui conduisent la translocation vers la matrice mitochondriale (Tim44, Tim14, Tim16, mtHsp70, et Mge1) [49].

-Le complexe TIM22 ; il participe à l'intégration des protéines à multi-domaines transmembranaire (par exemple, les transporteurs) dans la membrane interne. Il est organisé en dimère avec TIM22 et TIM18 insérés dans la membrane et TIM12, 9, 10 et 54 en périphérie du côté de l'espace inter-membranaire [50].

Il existe d'autres translocases plus spécialisées telles que le Mia (TIM40), impliquée dans l'import de certaines protéines de l'espace inter-membranaire [42] (pour revue).

2.2.3 Le complexe SAM

Après passage par le complexe TOM (TOM40), les protéines adressées à la membrane externe sont prises en charge par des chaperonnes dans l'espace inter-membranaire. Les protéines structurées en tonneau β et destinées à la MOM sont ensuite transférées au complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery) [51]. Ce dernier assure la médiation du repliement des protéines en structure tonneau β et donc leur insertion dans la MOM. Selon Takeda et al, la partie centrale du complexe SAM se compose de la protéine formant le canal (tonneau β) Sam50 (Tob55) et de deux protéines membranaires périphériques qui exposent les domaines au cytosol, Sam35 et Sam37 [52].

Toutes les protéines mitochondriales n'utilisent cependant pas les systèmes d'import. Par exemple, le cytochrome c a son propre système d'import couplé à son assemblage avec l'hème [53] (pour revue).

3. Les fonctions mitochondriales directement liées à l'apoptose

En 1993, Hockenbery et al ont proposé pour la première fois que la mitochondrie jouait un rôle dans l'apoptose en observant que Bcl-2 inhibait la production de ROS par les mitochondries [54]. En 1996, Susin et al ont identifié un premier facteur apoptogène relargué depuis la mitochondrie, l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) [55]. Cette étude a été suivie par celle de Kluck et al qui a montré que le relargage du cytochrome c était suffisant pour induire l'apoptose [56]. Depuis, cinq molécules relarguées de la mitochondrie ont été associées à l'apoptose, chacune avec des mécanismes d'action différents.

- L'AIF (Apoptosis Inducing Factor)

Bien que l'AIF soit le premier facteur apoptogène identifié, les mécanismes qui l'impliquent dans le processus de l'apoptose restent débattus jusqu'à présent. Initialement, Susin et al ont observé dans un système *in vitro*, que l'ajout de l'AIF fait subir aux noyaux isolés des modifications caractéristiques d'un état apoptotique telles que la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN nucléaire. De plus l'ajout d'un inhibiteur ciblant spécifiquement des caspases bloque l'effet de l'AIF [55]. Cependant, ces auteurs ont proposé ultérieurement que l'effet de l'AIF était indépendant des caspases mais plutôt lié à une endonucléase [57].

L'AIF est une protéine de 57kDa dont la structure résolue par Ye et al met en évidence une séquence de résidus périphériques fortement chargés positivement, bien que le point isoélectrique théorique calculé pour cette protéine soit neutre. Ils ont montré que cette région était non seulement nécessaire à la liaison de l'AIF directement avec l'ADN nucléaire, mais aussi que cette liaison était nécessaire pour déclencher l'apoptose [58]. Cette étude soutient donc l'hypothèse de l'AIF comme étant une endonucléase relarguée de la mitochondrie et indispensable à l'apoptose en se liant directement à l'ADN nucléaire afin de provoquer sa fragmentation. Cependant, l'inactivation du gène de l'AIF dans des cellules humaines (carcinomes de colon), a montré une meilleure sensibilité de ces cellules à l'apoptose, mais également une réduction de l'activité oxydoréductase du complexe I de la chaîne respiratoire [59]. Seules les cellules transfectées avec une forme de AIF qui conserve son activité NADH oxydase, retrouvent une activité normale de complexe I et sont de nouveau sensibles à l'apoptose. Ces auteurs concluent que « l'AIF maintient l'état transformé des cellules cancéreuses du colon grâce à son activité NADH oxydase, par des mécanismes qui impliquent la fonction du complexe I ». Dès lors, le rôle de facteur apoptogène de l'AIF a été discuté, d'autant plus que des

études *in vivo* suggèrent une implication plus directe de l'AIF dans des maladies liées à des déficiences du complexe I que dans des cancers [60].

- Le cytochrome c

Le cytochrome c est une hémoprotéine de 12,5kDa (protéine capable de lier l'hème) soluble dans l'espace inter-membranaire mitochondrial. Il sert de navette de transport d'électrons entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire.

Liu et al ont observé que l'immunodéplétion du cytochrome c dans des extraits cytosoliques de cellules apoptotiques, empêchait la fragmentation de l'ADN de noyaux isolés. Le rajout de cytochrome c exogène permettait de restaurer la fragmentation de l'ADN [61]. Par la suite, Kluck et al et Yang et al ont observé que le relargage de cytochrome c était inhibé par la surexpression de Bcl-2 [56], [62]. Ces données ont établi le rôle du relargage du cytochrome c dans le déclenchement de l'apoptose.

Comme nous l'avons dit plus haut, le cytochrome c participe à l'activation de la caspase 9 en se liant à Apaf-1 [32].

- Smac/Diablo

Comme discuté plus haut, SMAC/DIABLO est une protéine de 20kDa (forme mature) qui inhibe la dégradation des caspases 9 et 3 en se liant aux IAP. [36]. En parallèle, Verhagen et al ont identifié un facteur apoptogène co-immunoprécipité avec les IAP (Inhibitors of Apoptosis), DIABLO (Direct IAP Binding protein with Low pI), ce facteur a été identifié par spectrométrie de masse comme étant le SMAC [34].

- HtrA2/Omi

Verhagen et al ont également mis en évidence avec la même approche de co-immunoprécipitation un autre facteur apoptogène capable de se lier aux IAP, HtrA2/Omi [34]. Dans l'espace inter-membranaire, il joue un rôle de chaperonne et de protéase à cystéine afin d'éviter l'accumulation de protéines mal repliées dans la mitochondrie [60].

- EndonucléaseG

La fragmentation de l'ADN nucléaire est une caractéristique de l'apoptose et résulte de l'activation des nucléases dans les cellules en apoptose. La mise en évidence de l'endonucléase G (EndoG) mitochondriale comme un facteur apoptogène pouvant traverser la membrane nucléaire et provoquer la fragmentation de l'ADN, a démarré par l'observation de McIlroy et al . Dans le cytosol des cellules normales, CAD (Caspase Activated DNase) est en interaction stable avec son inhibiteur ICAD; l'initiation de l'apoptose entraîne l'activation de la caspase 3 qui va rompre l'interaction entre CAD et son inhibiteur; la CAD ainsi libérée va provoquer la fragmentation de l'ADN. Les auteurs ont observé que l'inhibition *in vivo* de la CAD n'était pas suffisante pour empêcher la fragmentation de l'ADN nucléaire lors de l'apoptose chez des souris transgéniques [63]. Ils en concluent qu'une autre nucléase indépendante de la caspase était probablement impliquée. En utilisant une approche biochimique sur des fibroblastes de souris embryonnaires n'exprimant pas CAD, Li et al ont mis en évidence que l'endonucléase G mitochondriale, une fois relarguée de la mitochondrie pouvait entraîner la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine indépendamment des caspases [64]. Cependant, la suppression du gène de l'endoG n'a montré aucun phénotype, suggérant l'implication d'une autre DNase que l'endoG dans la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose. En outre, tout comme l'AIF, l'implication et l'importance de l'endoG reste très débattue dans la littérature.

4. Les fonctions mitochondriales indirectement liées à l'apoptose

4.1. stockage de calcium et production de ROS

Le calcium (Ca^{2+}) intervient dans plusieurs voies de signalisation cellulaire et joue un rôle dans la régulation du métabolisme mitochondrial, la production d'ATP et la mort cellulaire. En séquestrant et en libérant le Ca^{2+} , les mitochondries jouent un rôle important dans la régulation du Ca^{2+} cellulaire. L'accumulation du Ca^{2+} par la mitochondrie fait suite à l'augmentation de sa concentration dans le cytosol. Le Ca^{2+} passe à travers la MOM via le canal VDAC [65]. L'uniport MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter) prend ensuite le relai pour l'accumulation du Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale [66]. L'accumulation matricielle du Ca^{2+} au-delà d'un certain seuil induit l'ouverture du PTP (Pore de Transition de Perméabilité) [67] (pour revue). L'ouverture de ce pore a pour conséquence le gonflement des mitochondries, la rupture de la membrane mitochondriale externe et donc la libération dans le cytosol, du contenu de l'espace inter-membranaire dont les facteurs apoptogènes. Ceci explique pourquoi ce processus a été initialement proposé comme étant

l'apoptose liée à la mitochondrie [68]. On sait maintenant que ce système est associé à la mort cellulaire qui se produit pendant l'ischémie/re-perfusion qui est une forme de nécrose [69], [70]. Plus récemment, une interaction entre VDAC et le récepteur IP3R a été mise en évidence [71] (pour revue). Cette interaction est régulée par la protéine anti-apoptotique Bcl-xL [72] [73] (pour revue). Par ailleurs le récepteur IP3R séquestre la protéine pro-apoptotique Bok dans le RE [74]. Ces données suggèrent un rôle du récepteur IP3R (responsable de la régulation des flux de calcium) dans l'apoptose *via* certaines protéines de la famille de Bcl-2.

La mitochondrie est la principale source de production des ROS notamment liée à l'activité de la chaîne respiratoire. De nombreux travaux ont montré que l'accumulation des ROS pouvait conduire à certaines formes de morts cellulaires dont l'apoptose. Dans certains cas le signal apoptotique induit par les ROS semble impliquer les protéines de la famille de Bcl-2 [75](pour revue).

4.2. La dynamique mitochondriale

Les mitochondries ne sont pas des organites statiques, elles se déplacent (le long du cytosquelette), se divisent et fusionnent continuellement. Dans des conditions normales, l'équilibre fusion/fission s'établit au profit de la fusion et les mitochondries apparaissent filamenteuses [76] (pour revue). L'inhibition de la composante fusion provoque la fragmentation des mitochondries. La fusion mitochondriale permet l'échange de protéines, de complexes respiratoires et de nucléoïdes, ne dépend pas du cytosquelette et est abolie par une dissipation du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi_m$) [76], [77] (pour revue).

Deux types de fusion mitochondriale ont été identifiés par Liu et al :

- La fusion instable (de type «*kiss and run*») processus selon lequel les mitochondries fusionnent leurs deux membranes, échangent des composants et se séparent presque immédiatement [78].
- La fusion stable processus qui conduit à la formation d'une mitochondrie allongée [77] (pour revue) .

Lorsque la fusion et la fission sont toutes deux inhibées, la morphologie des mitochondries de levure est similaire à celle observée dans un état basal, montrant ainsi que la forme est une conséquence de l'équilibre dynamique entre ces deux processus [76] (pour revue).

La machinerie de fusion chez les mammifères est constituée de trois protéines présentant des sous-localisations mitochondriales distinctes : les mitofusines 1 et 2 (MFN1 et MFN2), sont localisées sur la membrane mitochondriale externe et participent à sa fusion; OPA1 est localisé dans la

membrane interne et participe à sa fusion, mais aussi à l'ouverture des crêtes mitochondriales [79] (pour revue).

Les protéines régulant la fission les plus décrites sont la protéine liée à la dynamine 1/dynamine 1 like (DRP1/DNM1L) et la protéine de fission 1 (FIS1), qui sont situées dans la membrane externe [80]. Les protéines de la machinerie de fission liées à la membrane interne ne sont pas connues de nos jours chez les mammifères. Il est cependant admis que la fusion et la fission des deux membranes se font de manière coordonnée. Néanmoins, une protéine de levure, MDM33 a été montrée comme étant impliquée dans la machinerie de fission de la membrane interne [81].

La dynamique mitochondriale est régulée par la physiologie cellulaire. En outre, il a été observé que les mitochondries se fragmentent pendant l'apoptose [82] (pour revue). Par la suite, Karbowski et al ont observé que l'oligomérisation de la protéine pro-apoptotique Bax n'a lieu que dans des foyers apoptotiques discrets de la MOM qui correspondent à des zones où a lieu la fission de la mitochondrie [83]. Cependant Renault et al (2015) ont observé que dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) KO pour les mitofusines 1 ou 2 (MFN1 ou MFN2) (donc qui ne font pas de fusion de mitochondrie) l'inhibition de DRP1 (donc de la fission mitochondriale) restaure une morphologie basale des mitochondries. Ces dernières maintiennent leur capacité à initier l'apoptose [84].

D'autres études supportent l'implication de la dynamique mitochondriale dans l'apoptose. Par exemple, Jenner et al ont observé que l'interaction directe entre Bax et Drp1 est impliquée dans l'apoptose [85]. Réciproquement, il a été montré que Bax pourrait moduler la fonction de la mitofusine 2 [86]. La question d'une potentielle implication de la dynamique mitochondriale dans la régulation de l'apoptose reste encore très débattue dans la littérature.

III. La famille de Bcl-2 : effecteurs de la voie mitochondriale de l'apoptose

Les facteurs apoptogènes impliqués dans l'activation des caspases et donc dans l'implémentation de l'apoptose, sont localisés dans l'espace inter-membranaire des mitochondries dans les cellules non apoptotiques. Leur libération dans le cytosol requiert donc obligatoirement une perméabilisation contrôlée de la MOM. Cette étape est régulée par les protéines de la famille de Bcl-2 [87] (pour revue).

La protéine Bcl-2 a été le premier membre de la famille découvert. Le gène codant Bcl-2 (gène du chromosome 18) a été couplé par translocation chromosomique t(14;18) au locus de la chaîne lourde d'immunoglobuline, ce qui a entraîné une surexpression stable de la protéine Bcl-2 dans des lymphomes [88]. L'action oncogénique de Bcl-2 a dans un premier temps suggéré une implication de cette dernière dans la prolifération cellulaire. Vaux et al (1988) ont montré que dans des cellules de lymphoïdes et myéloïdes dépendantes de l'interleukine 3 (IL-3), lorsque IL-3 est retiré, les cellules exprimant Bcl-2 survivent mais restent en phase de croissance G0 [89]. Cette observation indique que Bcl-2 inhibe la mort cellulaire au lieu de favoriser la prolifération.

Tsujimoto a ensuite observé que Bcl-2 était capable de prévenir l'apoptose déclenchée par plusieurs stimuli, montrant que la voie de mort inhibée par Bcl-2 est unique et commune à différentes voies de signalisation [90].

Sur la base de leur similarité de séquence et de leur capacité à se lier à la protéine Bcl-2, un grand nombre de protéines apparentées à Bcl-2 ont été identifiées, constituant la famille de Bcl-2.

Dans les paragraphes qui suivent nous présenterons brièvement les protéines de la famille de Bcl-2 et les données de la littérature qui ont permis de mettre en évidence leur rôle dans l'apoptose. Les aspects mécanistiques ne seront abordés que dans la partie concernant Bax qui est le sujet d'étude de cette thèse.

1. Mise en évidence de l'importance des domaines BH pour la fonction des protéines de la famille de Bcl-2

Chez l'homme, la famille de Bcl-2 compte une vingtaine de membres, partageant toutes des domaines d'homologie avec la protéine Bcl-2. Ces domaines sont nommés BH pour "Bcl-2 homology domain". On en compte quatre, BH1, BH2, BH3 et BH4, chacun étant important pour le

réseau d'interactions qui régule l'activité des membres de la famille. Sur une base fonctionnelle, la famille est classiquement divisée en trois groupes (**fig 14**) [91] (pour revue) :

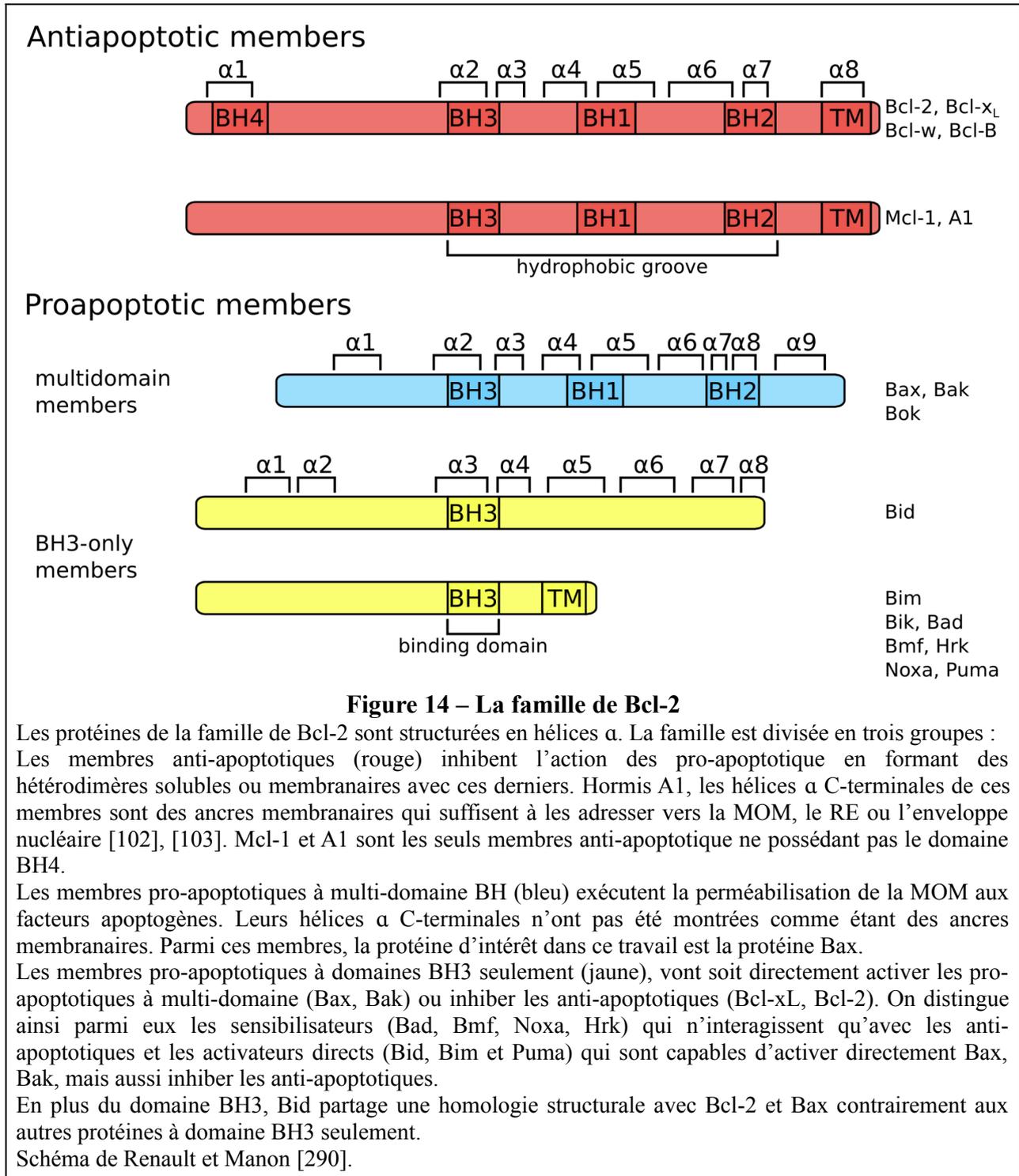
(i) les protéines anti-apoptotiques, qui partagent au moins les domaines d'homologies BH1, BH2, et BH3 avec Bcl-2 ; la plupart d'entre elles, telles que Bcl-xL, partage également le domaine BH4 (**fig 14**).

(ii) les protéines pro-apoptotiques à multi-domaines, Bax, Bak et Bok, partagent également les domaines d'homologies BH1, BH2 et BH3 avec Bcl-2; l'existence d'un domaine BH4 dans ces protéines est discutée (**fig 14**).

(iii) les protéines pro-apoptotiques à domaines BH3 seulement, qui ne contiennent que le domaine BH3 (**fig 14**).

L'ensemble de ces domaines forment des motifs qui sont directement impliqués dans les fonctions des membres de la famille.

Par exemple, Muchmore et al 1996 ont observé, par des études de RMN structurale, que les domaines BH1, BH2 et BH3 de Bcl-xL étaient suffisamment proches pour former un sillon hydrophobe [92]. Il a été montré par la suite que ce sillon joue un rôle important dans les interactions entre les protéines de la famille [93] (pour revue).



L'une des caractéristiques connues des protéines de la famille Bcl-2 est leur capacité à former des homodimères et des hétérodimères. Par exemple, Yin et al ont mis en évidence que, non seulement les domaines BH1 et BH2 de Bcl-2 étaient nécessaires à son activité anti-apoptotique, mais ont également suggéré que cette activité était possible par hétérodimérisation de Bcl-2 avec son partenaire anti-apoptotique Bax [94].

Concernant le domaine BH4, Huang et al ont montré que la substitution de deux des dix résidus conservés de ce domaine était suffisante pour inhiber l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 et de Bcl-xL tout en maintenant leur capacité à former des hétérodimères avec leurs partenaires pro-apoptotiques [95]. Malgré l'homologie structurale entre les protéines pro et anti-apoptotiques, l'existence du domaine BH4 dans la plupart des membres anti-apoptotiques et dont le retrait abroge leurs fonctions met un accent sur les différences fonctionnelles entre les membres pro- et anti-apoptotiques.

Le domaine BH3 est présent chez tous les membres de la famille. Des données phylogénétiques montrent qu'il existe, sous des formes plus ou moins conservées dans un grand nombre de protéines impliquées dans diverses fonctions [96], [97] (pour revue). La première preuve de l'implication du domaine BH3 dans l'apoptose a été obtenue par Chittenden et al, qui ont montré qu'un domaine de Bak et Bax distinct des domaines BH1 et BH2, était suffisant pour promouvoir l'apoptose. De plus, l'interaction entre Bax/Bak et Bcl-xL/ Bcl-2 implique ce domaine. Cette étude a mis en évidence le rôle primordial du domaine BH3 dans la promotion de la mort cellulaire. Cela a ouvert la voie à l'identification de molécules mimant les domaines BH3 [98]. De plus, une protéine chimérique Bcl-2 avec le domaine BH3 de Bax a converti Bcl-2 en une protéine pro-apoptotique pouvant initier la mort cellulaire. Ceci suggère une différence de séquence significative entre les domaines BH3 des membres anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille [99]. Ces études pionnières ont permis par la suite de concevoir des molécules mimant les effets des domaines BH3. La première d'entre elles, basée sur le domaine BH3 de Bak, a été nommée ABT-737 [100]. L'ABT-737 a montré son efficacité pour inhiber les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL. Ceci a ouvert la voie à la conception d'une série de molécules appelées BH3-mimétiques dont certaines sont maintenant utilisées en clinique [101] (pour revue).

2. Les membres anti-apoptotiques

Le groupe des protéines anti-apoptotiques comprend six membres. Leur principale fonction est de former des hétérodimères avec les pro-apoptotiques pour inhiber l'apoptose. Parmi ces protéines, trois partagent l'ensemble des domaines d'homologie avec Bcl-2 : Bcl-xL (Bcl-2 related gene long isoform), Bcl-w et Bcl-B. De plus leurs hélices α C-terminales ont été montrées comme étant des ancras membranaires [102], [103]. Deux autres protéines Mcl-1 (Myeloid cell leukemia 1), et A1 (Bcl-2 related gene A1) ne possèdent pas le domaine BH4.

Bcl-2 a été la première protéine anti-apoptotique à être découverte. Sa découverte, a été faite sur l'étude de lymphomes [88]. Janiak et al ont observé que l'hélice C-terminale de Bcl-2 était suffisante pour adresser un peptide cytosolique vers des membranes de RE et de mitochondries *in vitro*, montrant que cette hélice est une ancre membranaire [102]. Yin et al ont montré que l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 passe par l'hétérodimérisation avec Bax. En effet, des substitutions de la glycine 145 dans le domaine BH1 ou du tryptophane 188 dans le domaine BH2 étaient suffisantes pour abroger l'hétérodimérisation avec Bax et de façon subséquente l'activité anti-apoptotique [94].

Bcl-xL a été identifié sur la base de son homologie de séquence avec Bcl-2 et confirmé comme étant une protéine anti-apoptotique [104]. Sa structure a été élucidée par RMN et montre une similitude évidente avec les domaines porogènes de protéines bactériennes telles que la toxine diphtérique et les colicines [92]. Cette structure révèle que la protéine est composée de sept hélices α , deux hélices centrales hydrophobes entourées par des hélices amphipatiques. Une boucle non structurée relie les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$. En amont de l'hélice α C-terminale, il y a une région riche en résidus chargés positivement appelée «X domain». La substitution de ces résidus par des résidus d'alanine abroge l'adressage et l'insertion de Bcl-xL dans la MOM, montrant que l'hélice C-terminale de Bcl-xL est une ancre membranaire [103].

Comme Bcl-2, Bcl-xL forme un hétérodimère avec Bax. Cette interaction implique le domaine BH3 de Bax et le sillon hydrophobe formé par les domaines BH1, BH2 et BH3 de Bcl-xL [105]. La mutation de la glycine 138 (G138), qui est l'homologue de la glycine 145 (G145) de Bcl-2, en alanine (G138A) dans le domaine BH1 entraîne une perte d'interaction entre Bcl-xL et Bax en solution [106]. Minn et al ont montré que la formation d'un hétérodimère Bax/Bcl-xL soluble et inactif empêche la relocalisation de Bax vers la MOM [107]. A l'inverse, Renault et al ont montré que la surexpression de Bcl-xL entraîne la formation d'hétérodimères Bax/Bcl-xL inactifs mais localisés dans la MOM [108]. Ceci a également observé pour Bcl-2. Ces données montrent que les protéines anti-apoptotiques régulent la localisation mitochondriale des protéines pro-apoptotiques en l'occurrence Bax. Un autre processus allant dans le sens de cette régulation est la rétrotranslocation. Il a été montré que Bcl-2 et Bcl-xL rétrotransloquent Bax de la MOM vers le cytosol [109]. Dans le cas de Bcl-xL, Todt et al ont montré que la rétrotranslocation est dépendante des quatre derniers résidus de son hélice α C-terminale [110]. On peut alors se demander si Bcl-xL et Bcl-2 sont redondants.

Mcl-1(leucémie myéloïde-1) a été identifiée en premier dans les cellules de myéloïdes en différenciation [111]. Ces auteurs ont montré qu'elle contient les domaines BH1, BH2 et BH3.

D'autres études ont mis en évidence sa présence dans d'autres lignées cellulaires. Krajewski et al ont mis en évidence une différence d'expression *in vivo* entre Mcl-1 et Bcl-2. En effet, Des niveaux élevés de Mcl-1 sont détectés dans les couches apicales les plus différenciées des épithéliums, tandis que l'expression de Bcl-2 a tendance à être plus élevée dans la couche cellulaire basale [112]. Comme Bcl-2, l'hélice α C-terminale de Mcl-1 sert d'ancre membranaire [113].

Contrairement à Bcl-2 et Bcl-xL, Mcl-1 est régulée négativement au cours de l'apoptose dans de nombreux systèmes cellulaires. De plus, contrairement à ses deux homologues, elle a une durée de vie extrêmement courte (quelques minutes) probablement lié à la présence d'une séquence PEST dans son extrémité N-terminale. De plus, il a été montré que les caspases peuvent cliver Mcl-1 au niveau de deux résidus aspartate (Asp 127 et Asp 157 dans le Mcl-1 humain), ce qui pourrait expliquer sa régulation à la baisse [114] (pour revue).

Il existe moins de données biochimiques disponibles sur les autres membres anti-apoptotiques (Bfl-1 et Bcl-w).

3. Les membres pro-apoptotiques à mutidomains BH

Bax (Bcl-2 Associated X protein) a été mis en évidence comme étant une protéine associée à Bcl-2 *in vivo*. Cette protéine de 21kDa possède les domaines d'homologie BH1, BH2 et BH3 avec Bcl-2 et est capable de former des homodimères et des hétérodimères avec Bcl-2 [115]. De plus, lorsque Bax est surexprimé, l'apoptose est accélérée et l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 est inhibée. La protéine Bax est initialement cytosolique et est relocalisée dans la MOM suite à l'induction de l'apoptose [116], où il forme des oligomères permettant le relargage du cytochrome c [117]. Nous reviendrons plus en détail sur Bax dans la suite de ce travail. La structure de Bax soluble a été déterminée par RMN et montre une forte ressemblance avec celle de Bcl-xL [118].

Bak (Bcl-2 agoniste killer) est un homologue de Bax. Il a été montré que Bak et Bax ont des actions redondantes. En effet, des souris Bax^{-/-} ou Bak^{-/-} se développent normalement et ne présentent pas d'anomalies liées à une apoptose déficiente. A l'inverse lorsque ces souris sont accouplées pour créer des souris dépourvues des deux gènes, la majorité des animaux Bax^{-/-} Bak^{-/-} meurent avant la naissance. Moins de 10 % survivent jusqu'à l'âge adulte mais présentent de multiples défauts de développement, notamment une accumulation de cellules en excès dans les systèmes nerveux central et hématopoïétique [20]. Malgré cette redondance, Bax et Bak possèdent de nombreuses différences notamment dans leurs localisations dans les cellules saines. En effet Bax est majoritairement cytosolique, tandis que de Bak est constitutivement mitochondriale [119]. Cette

localisation mitochondriale est liée à son interaction avec VDAC2 [120]. Des études ont montré que Bak pouvait être relocalisée de la MOM vers les peroxysomes dans des cellules dépourvues de VDAC2 [121].

A l'origine, il a été proposé que l'expression de Bok (Bcl-2 Ovarian killer) soit strictement limitée aux cellules reproductrices [122]. Mais des études récentes ont montré que Bok était exprimée dans tous les tissus [123] (pour revue). Hsu et al ont montré que Bok était capable d'interagir avec certaines protéines anti-apoptotiques, Mcl-1 mais pas avec Bcl-2 et Bcl-xL contrairement à Bax et Bak qui peuvent interagir avec tous les membres anti-apoptotiques [122]. L'homologie de séquence avec Bax et Bak lui ont valu d'être classée comme membre pro-apoptotique à multi-domaine. Cependant son rôle dans l'apoptose reste mal compris voire controversé. Contrairement à Bak, Bok est constitutivement localisé dans le RE où elle est liée aux récepteurs de l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP3 Rs) [74]. De plus, Bok ne déclenche l'apoptose que dans des conditions de surexpression. Il existe donc un débat quant à la capacité de Bok endogène à initier l'apoptose comme Bax et Bak [123]. Une des explications pourrait être son interaction avec le récepteur IP3 le rendant ainsi non disponible pour être relocalisée vers la MOM.

4. Les membres pro-apoptotiques à domaine BH3 seulement

En fonction de leurs cibles, les protéines à domaines BH3 seulement peuvent être divisées en deux catégories :

- (i) les activateurs directs (Bid, Bim et Puma) : ils peuvent directement interagir avec les pro-apoptotiques à mutidomaines BH tel que Bax, ou Bak. Cette interaction induit un changement conformationnel qui entraîne l'activation de Bax et Bak conduisant à la perméabilisation de la MOM.
- (ii) les sensibilisateurs (Bad, Noxa, Hrk, Bmf) : ils n'interagissent qu'avec les membres anti-apoptotiques. Ils déplacent l'interaction entre les protéines pros et anti-apoptotiques, favorisant ainsi la libération des protéines pro-apoptotiques qui induisent ensuite la perméabilisation de la MOM.

Bid (BH3-interacting domain death agonist) : c'est la seule protéine à domaine BH3 seulement qui partage une homologie structurale avec les protéines de la famille à multi-domaines BH. Comme Bcl-2 et Bcl-xL, Bid possède deux hélices centrales, principalement hydrophobes, entourées de six hélices amphipathiques [91] (**fig 15**).

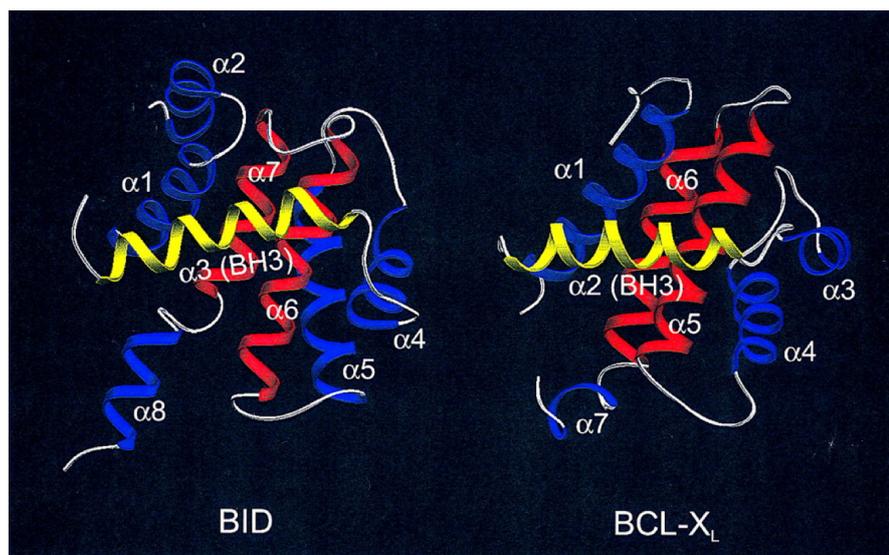


Figure 15 – Comparaison de la structure de Bcl-xL et Bid [91]

Bid a été initialement découvert par liaison à la fois à la protéine pro-apoptotique Bax et à la protéine anti-apoptotique Bcl-2 [124]. Desagher et al ont mis en évidence le fait que, dans les cellules Hela, lorsque l'apoptose est déclenchée, Bid migre vers la mitochondrie. Cette relocalisation est corrélée à un changement de conformation de Bax (qui expose son domaine N-terminal) et à la libération du cytochrome c [125]. Il a été montré ultérieurement que dans les conditions normales, Bid est sous forme inactive dans le cytosol; en conditions apoptotiques, il subit un clivage par la caspase8. La partie C-terminale du produit clivé (tBid) migre vers la MOM et favorise une apoptose dépendante de Bax et Bak [126]. Cartron et al ont montré qu'une mutation dans l'hélice $\alpha 1$ de Bax, D33A, abroge son interaction avec tBid. De même, plusieurs mutations dans la séquence BH3 de Bid, dont un mutant R84G, ont le même effet inhibiteur. Les charges opposées de ces deux résidus suggèrent qu'ils pourraient interagir, et des mutations d'échange de charges (D33R de Bax et R84D de Bid) ont restauré l'interaction [127].

Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death) a été mis évidence comme étant une protéine interagissant avec Bcl-2. L'analyse de sa séquence a montré qu'il s'agit d'une protéine à BH3 seulement avec un domaine transmembranaire (TM) [128]. Trois isoformes BimL, BimEL et BimS peuvent être générées par épissage alternatif avec pour seule différence leur extrémité N-terminale. Des études de criblage dans des cellules Hela en utilisant l'isoforme BimL comme appât ont montré que Bim est inactivé dans le cytosol par interaction avec la protéine LC8 de la dynéine du

cytosquelette. En effet, des mutations affectant cette interaction entraînent une augmentation de l'activité apoptotique de Bim [129].

Ainsi, Dans les cellules saines, Bim est associée à LC8 et donc séquestrée dans le complexe dynéine associé aux microtubules. Lorsque l'apoptose est initiée, Bim est libéré de ce complexe avec LC8 et peut ensuite être relocalisée vers la mitochondrie [129], [130] (pour revue) .

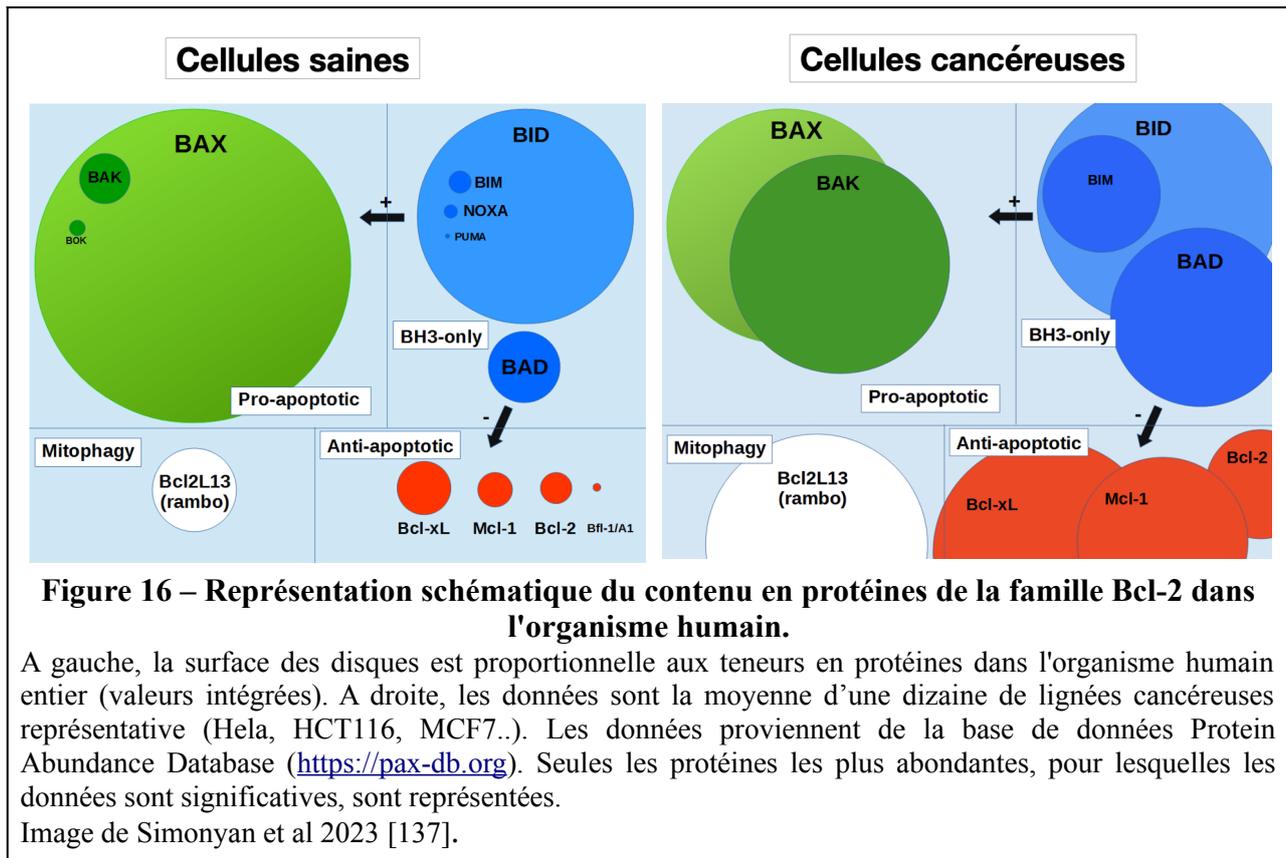
Nous décrivons plus loin les expériences qui ont permis de montrer que les mécanismes d'activation de Bax par tBid et par Bim sont distincts.

PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis) a été mis en évidence pour la première fois comme étant un gène régulé à la hausse par le facteur de transcription p53 suite aux dommages à l'ADN, et pouvant interagir avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 [131]. Il a ensuite été montré que Puma pouvait également induire l'apoptose indépendamment de p53 [132]. Kuwana et al ont montré que contrairement aux peptides BH3 de Bim et Bid qui sont suffisants pour activer Bax et induire la perméabilisation des liposomes, le peptide BH3 de Puma ne possède pas cette capacité [133]. Cependant, l'utilisation de la protéine Puma entière a montré des capacités comparables à ceux de Bid et Bim pour activer Bax [134]. Ceci a lancé le débat de savoir si Puma est un activateur direct ou un sensibilisateur. Des études *in vivo* ont montré que des souris Bid/Bim KO n'ont pas le même phénotype que les souris Bax/Bak KO, suggérant l'existence d'une autre voie d'activation de Bax et Bak. A l'inverse, des souris triple KO Bid/Bim/Puma récapitulent le phénotype des souris Bax/Bak KO montrant que PUMA peut agir comme un activateur direct [135], [136].

Les autres protéines à BH3 seulement dont Bad sont des sensibilisatrices qui activent l'apoptose en inhibant les protéines anti-apoptotiques mais n'agissent pas sur Bax. Nous ne détaillerons pas leur mode d'action ici.

5. Distribution des protéines de la famille de Bcl-2

A partir de la base de données Protein Abundance Database (<https://pax-db.org>), nous avons observé que Bax et Bid sont de loin les protéines de la famille de Bcl-2 les plus abondantes dans les cellules saines (**fig 16**) [137].



La différence devient moins visible dans les cellules cancéreuses. Néanmoins l'augmentation du niveau des membres anti-apoptotiques est corrélée avec celle des pro-apoptotiques à domaine BH3 seulement.

6. Le Complexe TOM et les protéines de la famille de Bcl-2

Ahting et al ont montré que les sous-unités TOM70 et TOM20 ne possèdent pas la séquence de ciblage permettant l'import des protéines mitochondriales, pourtant leur insertion dans la MOM nécessite le complexe TOM [138]. Ils en ont conclu que le complexe TOM n'assure pas seulement le transfert des précurseurs des protéines mitochondriales, mais aussi l'insertion de certaines protéines dans la membrane externe.

Les principales fonctions de la plupart des protéines de la famille de Bcl-2 ont lieu au niveau de la MOM. Les chercheurs ont longtemps pensé que les membres de la famille de Bcl-2 contenaient toutes les informations structurales suffisantes pour atteindre les mitochondries par eux-mêmes. Des études visant à déterminer la présence d'informations structurales de ciblage de la mitochondrie par ces protéines ont donc été menées. L'hélice C-terminale de Bcl-xL possède un motif riche en résidus chargés positivement nommé «X domain» ciblant spécifiquement la MOM. Il a été montré

que Bcl-2 possède un «X/2 domain», ce qui est corrélé avec une localisation plus ubiquitaire que celle de Bcl-xL [103]. Bax ne possède pas une telle séquence. Pourtant, la régulation de sa localisation dans la MOM permet de contrôler la survie ou la mort de la cellule. La localisation mitochondriale de Bcl-2 et Bax pourrait être plus variable que celle de Bcl-xL et donc plus soumise à des régulations cellulaires. Plusieurs travaux dans la littérature soutiennent l'hypothèse de récepteurs mitochondriaux pour les protéines de la famille de Bcl-2.

Motz et al ont montré que la localisation mitochondriale de Bcl-2 dans la levure était dépendante de la sous-unité TOM20. De plus la délétion sélective des autres sous-unités ne change pas la localisation mitochondriale de Bcl-2 [139]. Plus récemment, Lalier et al ont montré que dans les cellules de gliome U251, Bcl-2 est majoritairement localisée dans le RE en conditions non apoptotiques. Lorsque l'apoptose est déclenchée, Bcl-2 est relocalisé dans les MAM (zone de contact entre le RE et la MOM) et dans la MOM. Cette relocalisation de Bcl-2 est contrôlée par la sous-unité TOM20 du complexe TOM. Il est intéressant de noter que, dans des conditions apoptotiques, en cassant l'interaction entre Bcl-2 et TOM20 par un peptide compétiteur, les auteurs ont observé que l'action anti-apoptotique de Bcl-2 est potentialisée [140]. Ils concluent que l'interaction Bcl-2/TOM20 limite la fonction anti-apoptotique de Bcl-2. Ceci suggère une implication de TOM20 dans la régulation de l'apoptose.

Mcl-1, une autre protéine anti-apoptotique de la famille de Bcl-2, est moins ciblée vers la mitochondrie dans les cellules knock-down pour TOM70, comparées à des cellules contrôle [141]. Les auteurs ont déterminé qu'un domaine interne de Mcl-1 dont la séquence est EELD est nécessaire à son interaction avec TOM70. Une mutation dans cette zone abolit l'interaction Mcl-1/TOM70 et diminue significativement le ciblage de la MOM par Mcl-1. Ces données suggèrent que TOM70 joue le rôle de récepteur mitochondrial pour Mcl-1. De plus, contrairement aux pré-séquences des protéines importées par le complexe TOM qui sont chargées très positivement, ce motif EELD est au contraire chargé négativement. Cette différence montre que l'interaction établie entre les protéines importées et TOM70 est distincte de celle entre Mcl-1 et TOM70.

Comme presque tous les membres de la famille de Bcl-2, l'hélice α_9 de Bax a été prédite comme étant une ancre membranaire. Cependant, Cartron et al ont montré que des mutations dans l'hélice α_1 de Bax inhibaient son adressage à la mitochondrie, ce qui suggère que cette hélice porte un signal fonctionnel d'adressage à la mitochondrie [142]. Bellot et al ont identifié TOM22 comme

étant le récepteur de ce signal d'adressage. Dans leur travail, ils ont montré par immunoprécipitation que l'interaction Bax/TOM22 n'est observée que quand l'apoptose est déclenchée. De plus le knock-down de TOM22 par occupation de son extrémité N-terminale cytosolique par un anticorps inhibe la translocation de Bax dans la MOM et par conséquent inhibe aussi l'apoptose liée à Bax [143]. L'implication de TOM22 dans l'apoptose liée à Bax exprimée de façon hétérologue a également été observée chez la drosophile [144] et dans la levure [143], [145]. A l'inverse, d'autres auteurs ont observé que TOM22 n'est pas indispensable à la translocation mitochondriale de Bax. Par exemple, Sanjuan-Sklarz et al ont observé que Bax (étiqueté His6 en N-terminale) est capable de relarguer le cytochrome c depuis des mitochondries de levure sur lesquelles TOM22 et TOM70 ont été éliminés par protéolyse [146]. Ross et al ont observé que l'import du mutant Bax S184V, précédemment montré comme étant constitutivement mitochondrial [118], n'est pas affecté par la digestion protéolytique des composants de TOM dans des mitochondries humaines [147]. L'implication de TOM22 dans la localisation mitochondriale de Bax reste donc sujette à débat.

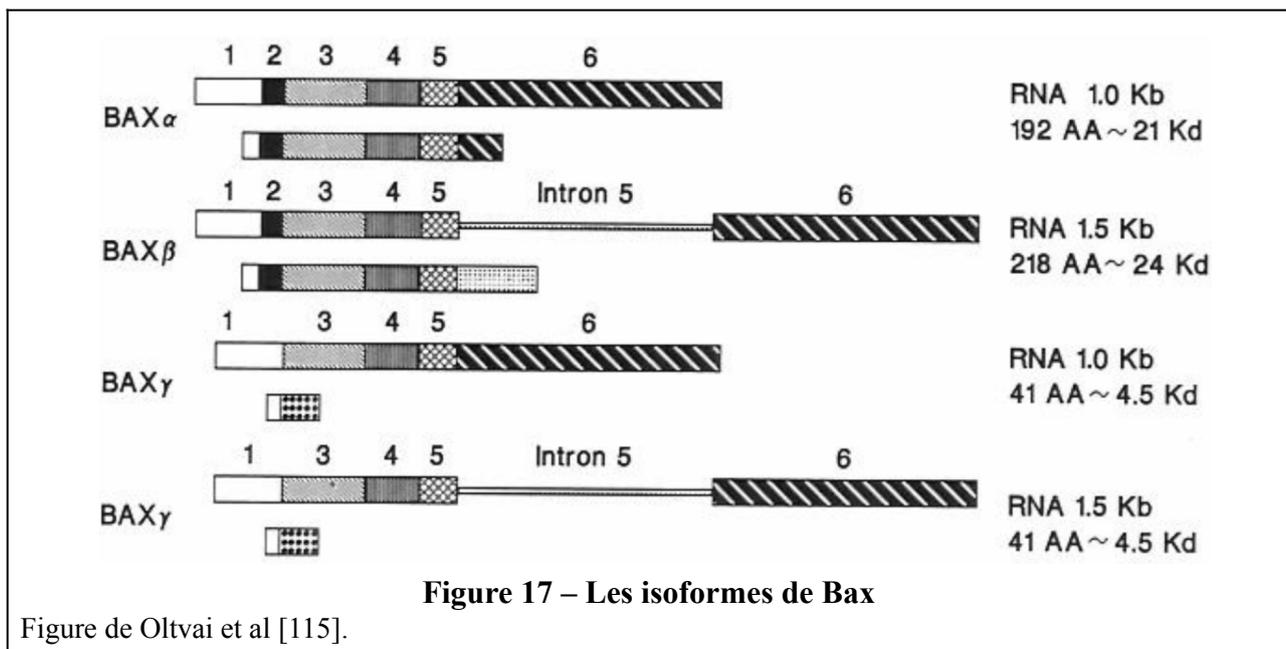
Contrairement à Bax, Bak est constitutivement inséré dans la MOM, même en conditions non apoptotiques. Mais, comme Bax, sa localisation mitochondriale dépend des protéines de la MOM [148] (pour revue). Cartron et al ont montré que dans les conditions normales ou apoptotiques, Bak associée à la MOM est dans un complexe multi-protéique composé de VDAC2/Mtx1/Mtx2. Après l'induction de l'apoptose, Bak passe de son association avec Mtx2 et VDAC2 à une interaction avec Mtx1. De plus, la déphosphorylation de Mtx1 augmente son interaction avec Bak tout en diminuant l'interaction Bak/VDAC2. La localisation mitochondriale de Bak dépend donc de son interaction avec les récepteurs mitochondriaux au sein des complexes multiprotéiques, et le passage de Bak des complexes en conditions non apoptotiques aux complexes apoptotiques dépend du changement de conformation de Bak et de la déphosphorylation de Mtx1 [149]. Ces données montrent que hormis le complexe TOM, d'autres complexes de la MOM régulent la localisation et l'activité des protéines de la famille de Bcl-2.

IV. La protéine pro-apoptotique Bax

1. Présentation générale

Bax (Bcl-2 Associated X protein) a été décrite pour la première fois par Oltvai et al (1993). La fonction anti-apoptotique de Bcl-2 était connue mais ses localisations subcellulaires multiples (mitochondrie, RE et membrane nucléaire) et l'absence de motifs connus ne permettaient pas de lui attribuer une fonction biochimique. Ceci les a conduits à rechercher si la fonction de Bcl-2 pouvait être conférée par sa présence dans un complexe multi-protéique. Dans cette optique, ils ont réalisé des co-immunoprécipitations qui ont révélé Bax comme une protéine partenaire de Bcl-2 *in vivo*.

Bax est une protéine de 21kDa, codée par un gène composé de 6 exons et 5 introns. Trois isoformes peuvent être générées par épissage alternatif (**fig 17**) :



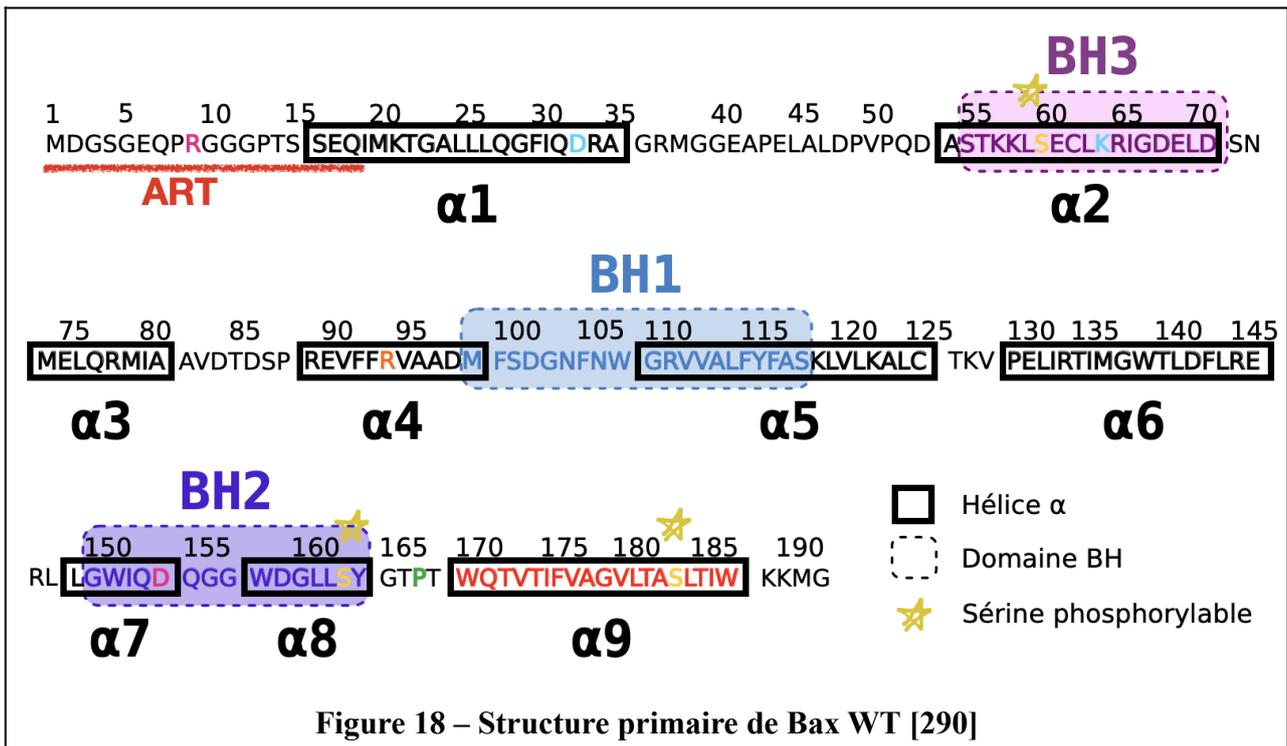
-Bax α (appelé Bax WT dans ce travail), constitué de 192 acides aminés (21kDa). Sa séquence primaire est présentée en **figure 18**.

-Bax β constitué de 218 acides aminés (24kDa) est dépourvue de l'extrémité C-terminale hydrophobe de Bax α mais qui est remplacé par une séquence plus longue et globalement hydrophile. Cet isoforme pourrait donc être exclusivement cytosolique.

-Bax γ correspond est un peptide de 41 premiers acides aminés comprenant les premiers résidus de Bax α . Sa fonction n'est pas très claire [115].

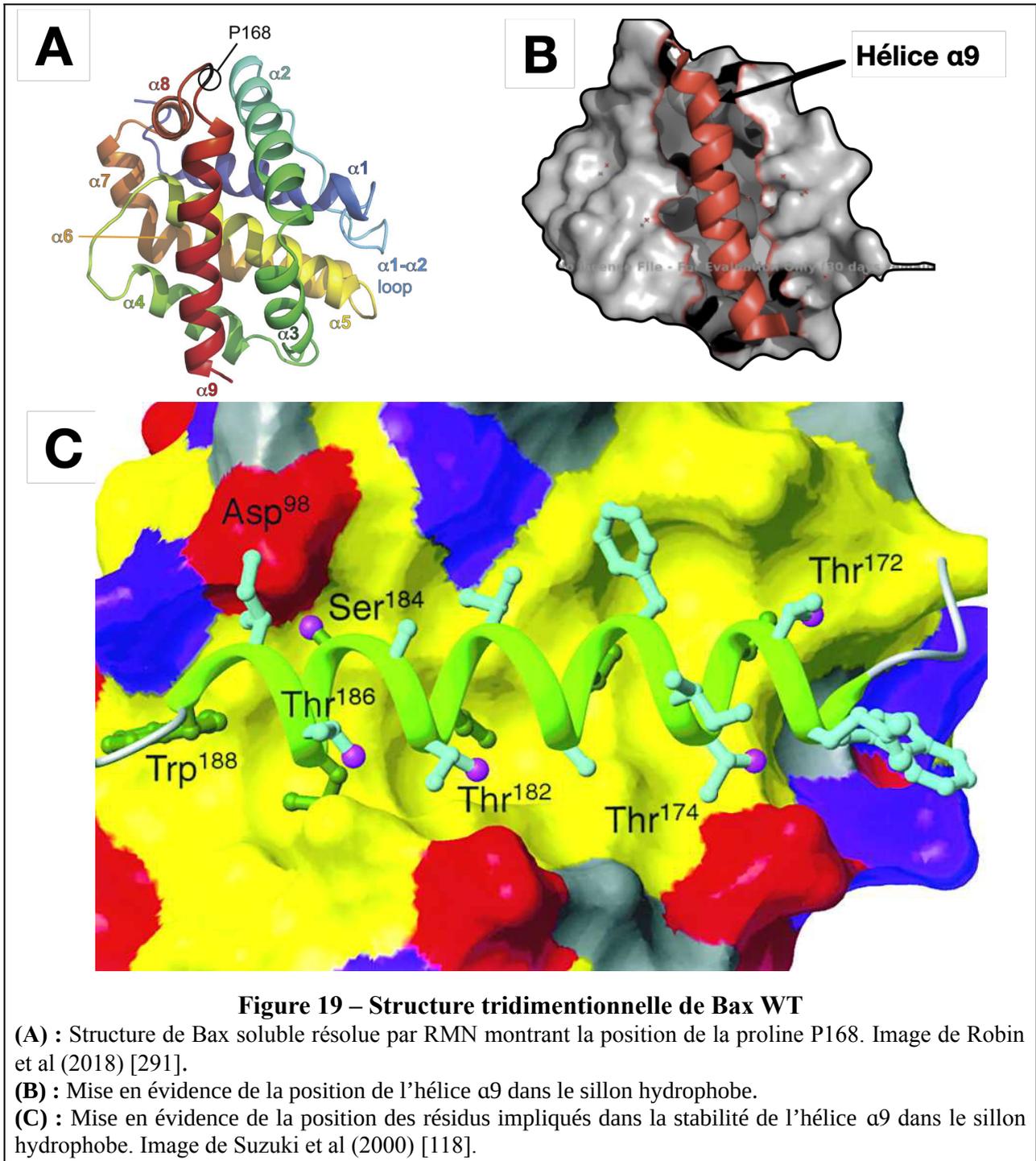
D'autres isoformes ont été mises en évidence depuis l'étude d'Oltvai et al. Par exemple, Bax Ψ est dépourvue des 19 premiers acides aminés de Bax α . Elle est constitutivement mitochondriale et active *in cellulo* et est plus efficace que Bax α pour la suppression de tumeurs [150] [151].

La superposition de la structure primaire de Bax WT avec celle de Bcl-2 a mis en évidence la présence des trois domaines d'homologies de Bcl-2 hautement conservés, BH1, BH2 et BH3 [115].



La structure tridimensionnelle de Bax WT a été résolue par RMN [118]. Bax est composé de 9 hélices α (**fig 19A**). L'hélice $\alpha 5$ centrale hydrophobe (hélice $\alpha 5$) entouré par les huit autres hélices α qui sont plus ou moins amphiphiles (**fig 19A**). Les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ sont organisées en structure en épingle à cheveux rappelant celle des toxines diphtériques bactériennes.

Dans sa configuration soluble, les hélices $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ de Bax forment un sillon hydrophobe dans lequel est stabilisée l'hélice $\alpha 9$ C-terminale (**fig 19B**). Cette hélice est en majorité de nature hydrophobe, mais est également riche en résidus hydroxylés (Thréonine 172, 174, 182, 186 et sérine 184). A l'exception de la sérine 184, les autres résidus hydroxylés sont tous orientés vers le solvant, contribuant ainsi à maintenir une configuration soluble de la protéine (**fig 19C**).



La sérine 184 orientée vers la face hydrophobe du sillon, pointe vers l'aspartate 98 pour former une liaison hydrogène qui contribue à augmenter la stabilité de l'hélice $\alpha 9$ dans le sillon.

2. Localisation subcellulaire de Bax

2.1. Propriétés de la conformation soluble de Bax

Bax est le seul membre de la famille de Bcl-2 qui accueille préférentiellement son hélice α C-terminale dans le sillon hydrophobe, protégeant le caractère hydrophobe de cette hélice et permettant ainsi à la protéine de rester soluble dans le cytosol [118].

Cette caractéristique unique de Bax parmi les protéines de la famille fait qu'elle est en majorité cytosolique dans les cellules saines contrairement à Bcl-2 ou Bak. En outre les données issues de la «Protein Abundance Database » suggèrent que Bax est environ dix fois plus abondant que les protéines anti-apoptotiques (**fig 16**). Ceci remet en perspective l'hypothèse du «rhéostat» selon laquelle Bax est maintenue dans un état inactif par hétérodimérisation avec les protéines anti-apoptotiques dans les cellules saines [152]. Suzuki et al ont suggéré que cette configuration de l'hélice α 9 dans le sillon hydrophobe fait que la dimérisation avec d'autres protéines de la famille *via* cette poche ne peut pas se produire dans le cytosol sans un apport énergétique pour désengager l'hélice α 9. Garner et al ont rapporté l'existence d'un dimère inactif de Bax dans le cytosol. Ce dimère implique la neutralisation de l'hélice α 9 d'un monomère et l'extrémité N-terminale du second monomère [153]. Ainsi ce dimère neutralise les deux domaines de Bax nécessaires au changement conformationnel entraînant son insertion dans la MOM [154]. Prises ensemble, ces données montrent que Bax est capable de s'auto-inhiber, et donc de se maintenir de lui-même dans une conformation inactive et cytosolique. Nous allons donc analyser l'implication de chaque extrémité de Bax dans le maintien de cette conformation.

2.1.1. L'extrémité N-terminale : ART (Apoptotic Regulation of Targeting).

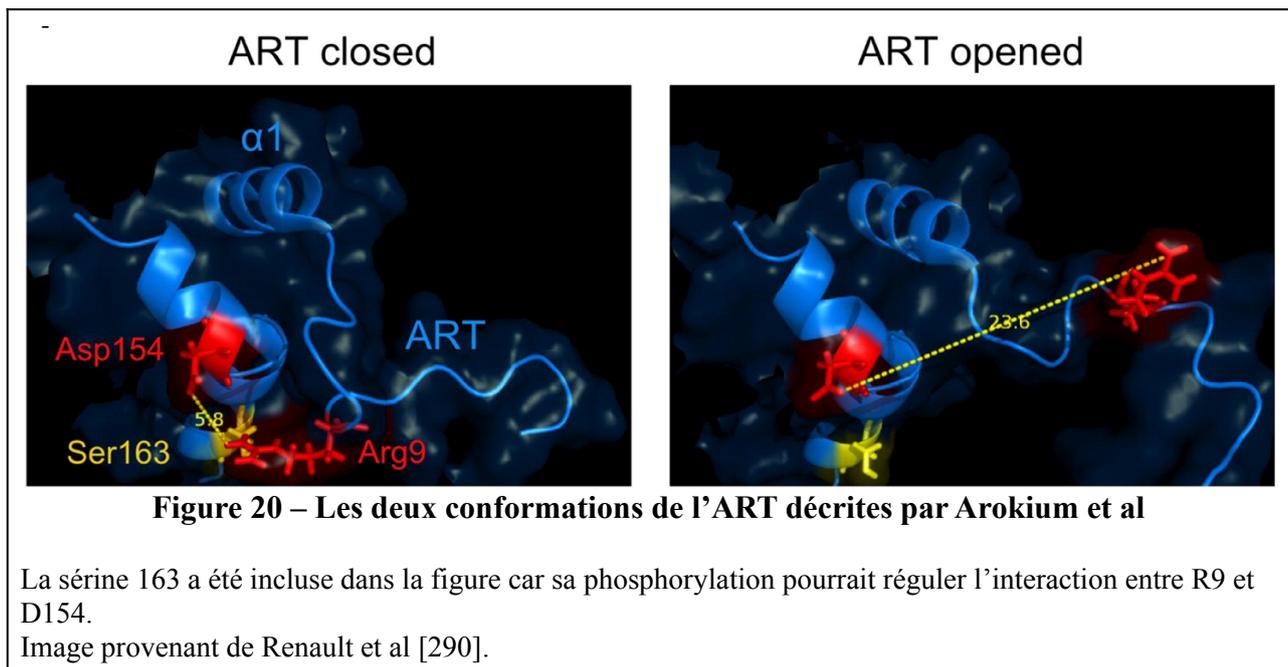
L'ART représente l'extrémité N-terminale de Bax ; apparaissant non structurée en RMN (**fig 19A**), elle est constituée des 19 premiers résidus de la protéine (**fig 18**). Goping et al (1998) ont montré que ce domaine de Bax régule sa translocation vers la MOM. Ces auteurs sont partis du constat que la relocalisation de Bax vers la MOM était corrélée avec un changement de conformation de son extrémité N-terminale. En effet, ce domaine devient éligible à une protéolyse contrôlée par la protéinase K après la translocation de Bax dans la MOM. Cette fraction de Bax clivée n'est plus reconnue par l'anticorps N20 dirigé contre les résidus 11-30, montrant que ce domaine subit un changement conformationnel entraînant son exposition et donc son clivage par la protéinase K. Les auteurs ont ensuite généré plusieurs variants de Bax délétés en N-terminal. La délétion complète des résidus 1-19, génère une protéine constitutivement insérée dans la MOM et relarguant le

cytochrome c [150]. Ils ont nommé ce domaine (1-19) ART pour «Apoptotic Regulation of Targeting».

Cartron et al (2002) ont montré l'existence d'un variant naturel de Bax, appelé Bax Ψ , dans les glioblastomes de bas grade, qui est constitutivement mitochondrial et actif [151]. Ce variant de Bax contribue à ralentir la progression tumorale de façon plus efficace que Bax^{WT}. Le fait le plus intéressant concernant le Bax Ψ est qu'il est issu d'un épissage alternatif qui fait que la traduction démarre à la Méthionine 20 au lieu de la Méthionine initiatrice 1. Le Bax Ψ ne contient donc pas les résidus 1-19 tout comme le Bax Δ ART généré par Goping et al.

Prises ensembles, ces données montrent le rôle important que joue l'ART dans la régulation de la translocation de Bax vers la MOM.

L'ART apparaît comme un domaine non structuré en RMN, et donc doué d'une mobilité importante. Il contient une séquence PRGGGP (résidus 8-13) formé de quatre résidus très mobiles encadrés par deux résidus proline rigides. Des mutations visant à diminuer ou à augmenter la rigidité de cette séquence changent la capacité de Bax à se localiser à la MOM [155], [156].



Arokium et al ont montré l'existence de deux conformations relativement stables de l'ART (**fig 20**). Cette stabilité est fonction de l'arginine 9 (R9). Dans la conformation qu'ils ont nommée « conformation fermée», l'arginine 9 est proche de l'aspartate 154 (D154) de l'hélice α 7. Cette proximité favorise la formation d'une liaison ionique (**fig 20 côté gauche**). A l'inverse, dans la conformation nommée «conformation ouverte» l'arginine 9 est éloignée de l'aspartate 154 rompant

ainsi la liaison (**fig 20 côté droit**). L'inversion des charges (R9E) ou (D154K) a conduit à générer des mutants de Bax constitutivement membranaires et actifs dans la levure. De plus, le double mutant R9E D154K rétablit le comportement de Bax WT, montrant que la conformation fermée de l'ART régule négativement la translocation de Bax vers la MOM [157].

2.1.2. L'extrémité C-terminale : implication de la stabilité de l'hélice $\alpha 9$ dans le sillon hydrophobe

Wolter et al ont montré que dans des conditions non apoptotiques, Bax est cytosolique et est relocalisé vers la MOM lorsque l'apoptose est initiée [116]. Cette relocalisation est dépendante de l'insertion de l'hélice $\alpha 9$ car le retrait de cette dernière abroge la localisation mitochondriale de Bax [158]. Ceci montre que l'hélice $\alpha 9$ de Bax est nécessaire pour son insertion dans la MOM. Or, dans la structure soluble de Bax décrite par Suzuki et al, l'hélice $\alpha 9$ est stabilisée dans le sillon hydrophobe. Les résidus hydroxylés dans cette hélice sont orientés vers le solvant réduisant ainsi la surface hydrophobe occupée par cette hélice. La sérine 184 est orientée vers la face hydrophobe du sillon et, pointe vers l'aspartate 98 avec lequel elle forme une liaison hydrogène qui contribue à augmenter la stabilité de l'hélice $\alpha 9$ dans le sillon [118]. Cette configuration contribue fortement à maintenir Bax dans une conformation soluble. D'ailleurs, la délétion ou la mutation de la sérine 184 en alanine ou en valine entraîne une localisation constitutive de Bax dans la MOM [158]. Il a d'autre part été montré que cette sérine peut être phosphorylée par la protéine kinase de survie AKT. La sérine 184 étant localisée en face de l'aspartate 98, on pourrait alors envisager que la charge négative du phosphate crée une répulsion avec celle de l'aspartate 98, entraînant ainsi le dégagement de l'hélice $\alpha 9$ et donc l'insertion de Bax. Cependant, les auteurs ont observé que Bax phosphorylé est séquestré dans le cytosol. Ceci est cohérent avec la fonction de la kinase AKT, mais incohérent avec le comportement attendu pour Bax [159], [160]. Ces travaux ont été à la base de l'identification de nouveaux ligands de Bax capables d'activer l'apoptose en empêchant sa phosphorylation [161]. Cependant, des expériences réalisées dans la levure avec un mutant phosphomimétique (Bax S184D) ont montré qu'une fraction minoritaire de la protéine se localise spontanément dans la MOM où elle forme des pores relarguant le cytochrome c [162]. Les effets de la phosphorylation sur cette sérine ne sont toujours pas complètement élucidés. Néanmoins la sérine 184 semble jouer un rôle dans la régulation de la translocation de Bax vers la MOM au cours de l'apoptose [163].

Un autre résidu important pour la stabilité de l'hélice $\alpha 9$ dans le sillon hydrophobe est la proline (P168) localisé dans la boucle entre les hélices $\alpha 8$ et $\alpha 9$. Cartron et al (2005) et Arokium et al (2004) ont montré que des mutants Bax P168A et P168V sont constitutivement mitochondriaux et actifs dans des glioblastomes humains et dans la levure [155], [164]. De plus, Simonyan et al ont montré que le mutant Bax P168A est capable de perméabiliser des LUVs avec une efficacité légèrement supérieure à celle de Bax WT [165]. Les auteurs ont proposé que la facilitation de la transition cis/trans lié au remplacement de la proline par l'alanine ou la valine favorise le dégagement de l'hélice $\alpha 9$ de la poche hydrophobe.

Cependant, d'autres auteurs ont montré que la mutation de cette proline en glycine ou en alanine dans des protéines de fusion GFP-Bax entraînaient une rétention de Bax dans le cytosol [166]. Plus récemment, Garner et al ont observé que le mutant Bax P168G formait des dimères inactifs dans le cytosol [153].

Ces expériences montrent que la déstabilisation de l'hélice $\alpha 9$ du sillon hydrophobe est une étape critique dans la localisation de Bax dans la MOM. Cependant les contradictions rapportées plus haut suggèrent que d'autres domaines, probablement du côté N-terminal, participent à la régulation de ce processus.

2.1.3. Implication d'autres partenaires dans le maintien d'une forme soluble de Bax

Il a été montré que les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL peuvent inhiber Bax en formant un hétérodimère cytosolique avec ce dernier. Cet hétérodimère séquestre le domaine BH3 de Bax et le maintient en dehors de la MOM [107]. Par la suite, Edlich et al ont mis en évidence que Bcl-xL peut rétrotransloquer Bax depuis la MOM vers le cytosol [109]. Ce processus a été proposé comme étant un mécanisme de rétention de Bax dans le cytosol. Des expériences ont montré qu'il pourrait être corrélé à la phosphorylation de la sérine 184 de Bax [167].

Par criblage dans la levure, une protéine inhibant la localisation mitochondriale de Bax a été identifié et nommée Bax inhibitor 1 [168]. Cette protéine est conservée chez tous les eucaryotes (animaux, plantes et champignons) et est un régulateur des voies de signalisations liées aux stress calcique [169] (pour revue). Curieusement, l'homologue levure de cette protéine (BXI1) est la seule protéine de levure possédant un domaine BH3 [170]. Des données non publiées ont montré que la surexpression de Bax inhibitor 1 de plantes inhibe la localisation mitochondriale de Bax et le relargage du cytochrome c dans la levure.

Il existe d'autres protéines dont la surexpression ou la délétion module la capacité de Bax à se relocaliser à la mitochondrie, mais le mécanisme biochimique par lequel elles agissent n'est pas élucidé [171] (pour revue).

2.2. Adressage de Bax à la mitochondrie

L'adressage et l'insertion de Bax dans la MOM font suite à un changement conformationnel qui est attribué aux protéines à BH3 seulement activatrices (Bid, Bim ou Puma). Après son insertion, Bax expose un domaine de son extrémité N-terminale qui est alors reconnu par un anticorps conformationnel (6A7) [172]. L'épitope de l'anticorps monoclonal 6A7 est formé des résidus 13–19 (PTSSEQI). Peyerl et al ont co-cristallisé un peptide contenant l'épitope complexé avec l'anticorps 6A7. Ils ont montré que la liaison du 6A7 à son épitope dans Bax ne pourrait avoir lieu que suite à de profonds changements conformationnels de Bax permettant de déplacer son hélice $\alpha 1$. Ceci montre que les changements conformationnels N-terminaux de Bax sont certainement des conditions préalables, plutôt que des conséquences de l'insertion de Bax dans la MOM. [173].

Il a été montré que l'interaction de Bax avec une bicouche lipidique suffit à exposer cet épitope [174].

Cartron et al ont montré que l'hélice $\alpha 1$ de Bax possède un signal d'adressage à la MOM. En effet, le retrait de cette hélice dans Bax Ψ (qui est constitutivement mitochondriale et active) abroge son interaction avec la mitochondrie. De plus, des mutations ponctuelles dans cette hélice (A24R ou L26V) sont suffisantes pour empêcher l'adressage de Bax vers la mitochondrie. De plus, la fusion de l'hélice $\alpha 1$ de Bax avec la RFP est suffisante pour la localiser à la MOM, mais pas pour son insertion [175]. De plus, cette protéine chimère fait compétition à Bax Ψ pour l'interaction avec la mitochondrie. Ces données suggèrent l'existence d'un récepteur mitochondrial pour le signal d'adressage porté par l'hélice $\alpha 1$ de Bax.

Dans une autre étude, Cartron et al ont mis en évidence l'importance de cette hélice dans l'interaction de Bax avec les protéines à domaine BH3 seulement activatrices tel que Bid et Puma. En effet, la mutation de l'aspartate 33 (D33) en alanine (D33A) dans l'hélice $\alpha 1$ de Bax abroge son interaction avec tBid et Puma [127]. On pourrait alors envisager que, suite à sa relocalisation dans la MOM après son clivage par la caspase8, tBid serve de récepteur à Bax. Cependant, le fait que la localisation mitochondriale de Bax Ψ (constitutivement mitochondriale) dépend également de l'adressage *via* l'hélice $\alpha 1$ suggère que le récepteur est une protéine résidente de la MOM.

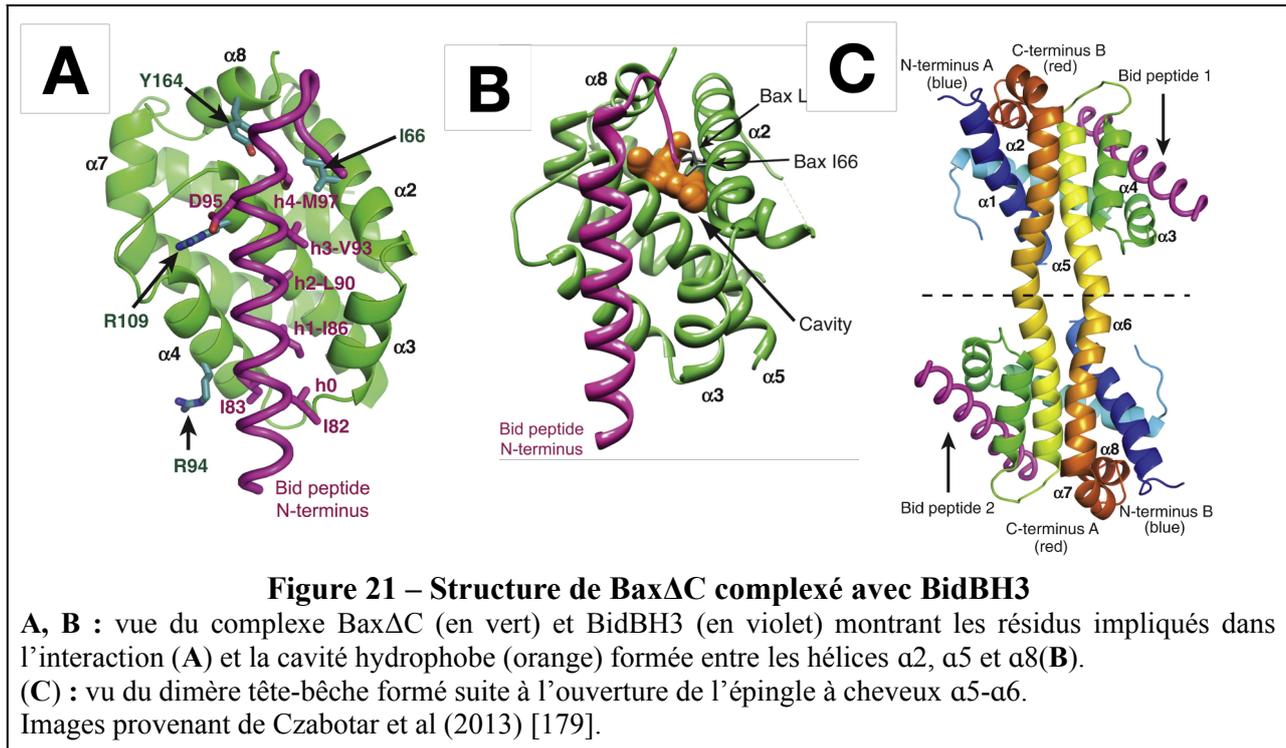
Dans l'optique d'identifier un potentiel récepteur de Bax dans la MOM, les mêmes auteurs ont réalisé des tests de double hybride dans la bactérie et identifié TOM22 comme un interactant de l'hélice $\alpha 1$ de Bax [127]. Bellot et al. ont ensuite montré que la réduction de l'expression de TOM22 abolit l'interaction de Bax avec la mitochondrie, et inhibe ainsi l'apoptose liée à Bax. De façon intéressante, le «peptide mapping» a identifié l'hélice $\alpha 1$ et la boucle entre les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ comme les domaines de Bax impliqués dans son interaction avec TOM22 [143]. Ils ont ainsi proposé que TOM22 était le récepteur mitochondrial de Bax. Les mêmes auteurs ont suggéré par la suite que le complexe TOM, auquel appartient TOM22, joue un rôle dans l'insertion de Bax dans une conformation propice à l'oligomérisation [176].

2.2.1. Changements conformationnels liés à l'activation de Bax

Dans les cellules saines, Bax est en majorité localisée dans le cytosol [116] ou faiblement associée à la MOM [177] (pour revue), mais certaines données montrent également une localisation au RE [178]. Pour déclencher la perméabilisation de la MOM, Bax doit donc subir un changement conformationnel pour être transloqué et s'insérer dans la MOM. Ainsi, Bax passe d'une conformation inactive à une conformation active. Deux modes d'activation de Bax ont été décrits dans la littérature.

L'activation directe : Elle est exercée par les protéines à BH3 seulement activatrices, tBid, Bim ou Puma. Ils engagent leurs domaines BH3, soit dans le sillon hydrophobe (dans le cas de Bid), soit dans le domaine N-terminal (dans le cas de Bim), pour une interaction transitoire de type "touch and run".

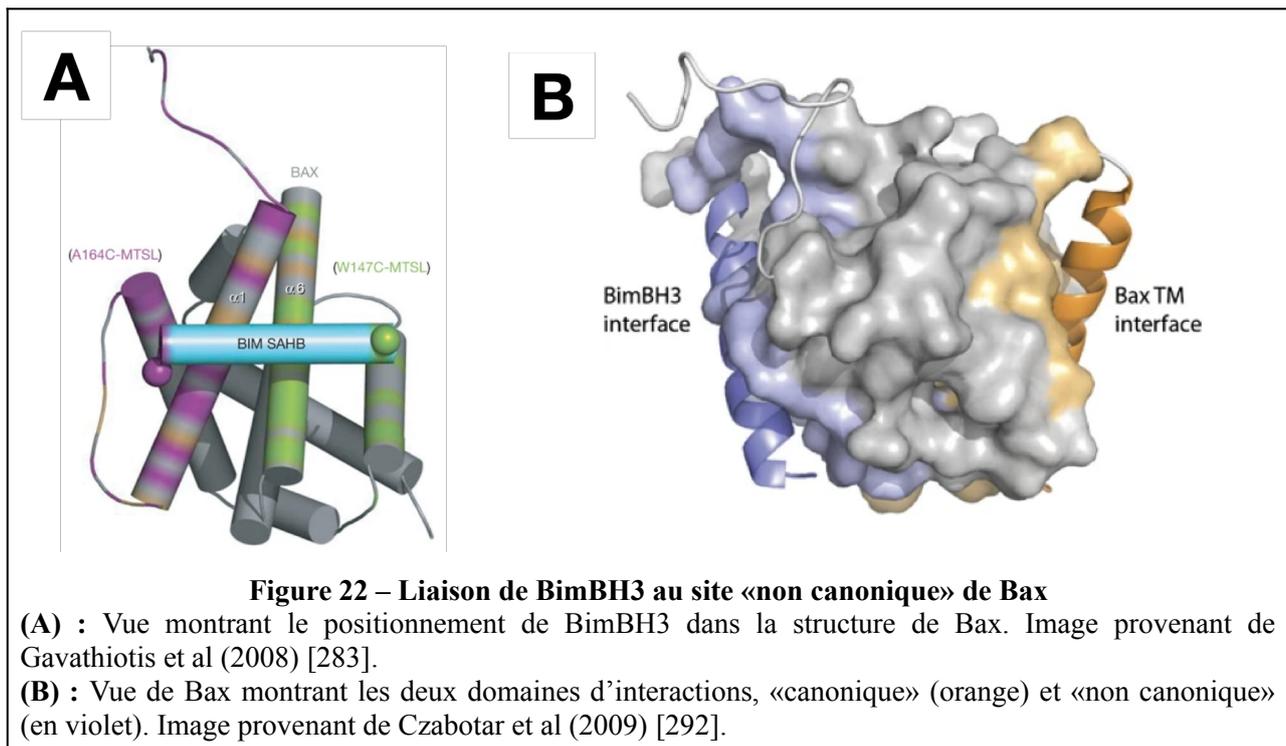
Les mécanismes d'action de Bid et Bim ont essentiellement été étudiés en utilisant des peptides représentant leurs domaines BH3. Czabotar et al ont résolu la structure de Bax (dépourvue de l'hélice C-terminale) en interaction avec le peptide BH3 de Bid. Ces données permettent de mettre en évidence les changements conformationnels de Bax induits par Bid. Ils ont montré que BidBH3 change profondément la conformation de Bax induisant ainsi sa dimérisation [179].



Le peptide Bid-BH3 interagit avec la protéine en insérant les quatre résidus hydrophobes caractéristiques du BH3 (I86, L90, V93 et M97) dans le sillon hydrophobe de Bax (**fig 21A**). La structure de ce complexe Bax Δ C/Bid-BH3 montre la présence d'une cavité entre les hélices α 2, α 5 et α 8 de Bax (**fig 21B**) ce qui n'existe ni pour Bax sans le peptide lié ni pour les protéines anti-apoptotiques (Bcl-xL par exemple) liées aux peptides BH3. En général, les cavités déstabilisent les protéines globulaires favorisant dans ce cas précis, l'extrusion de l'hélice α 2 (domaine BH3). Ces peptides BH3 induisent donc une structure Bax métastable qui facilite la libération de son hélice α 2 vis-à-vis du noyau de la protéine. La libération de ce domaine est une étape critique vers la dimérisation de Bax [179]. Le fait que cette étude ait été réalisée sur Bax Δ C ne permet cependant pas d'apprécier les conséquences du changement conformationnel sur la stabilité de l'hélice α 9 dans le sillon hydrophobe.

Un autre domaine d'interaction entre Bax et les protéines à BH3 seulement a été mis en évidence par le groupe de Walensky. Pour maintenir la structure hélicoïdale des peptides BH3, ces auteurs ont développé une technique basée sur la substitution de deux résidus de la même face par des S-pentenyl alanine. La liaison entre ces deux dérivés permet de stabiliser une structure hélicoïdale des peptides BH3 qu'ils ont nommés « hélice α stabilisée des domaines Bcl-2 » (SAHB) [180].

En utilisant des peptides SAHB du domaine BH3 de Bim, Gavathiotis et al ont montré par RMN que ce peptide se lie au niveau des hélices $\alpha 1$, de la boucle entre les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$, et au niveau de l'hélice $\alpha 6$ de Bax (**fig 22A**). Cette zone correspond à une interface de la protéine différente de celle du sillon hydrophobe connue pour recevoir les domaines BH3 de Bcl-2 ou de Bid par exemple (**fig 22B**) [181]. Pour les différencier, les auteurs utilisent les termes de domaine "canonique" (pour tBid) et de domaine "non canonique" (pour Bim).



La même équipe a ensuite élucidé les changements conformationnels de Bax induits par BimBH3 par RMN. Ils ont montré que la liaison du peptide BH3 entraîne le déplacement de la boucle entre les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Ce déplacement s'accompagne d'une succession de petits changements conformationnels aboutissant probablement à la libération de l'hélice $\alpha 9$ de la poche hydrophobe et à son insertion dans la MOM [154].

Ceci marque une différence dans les mécanismes d'action de Bid et Bim dans l'activation de Bax. De façon intéressante, les signaux d'initiation de l'apoptose qui activent ces deux protéines sont également différents: l'activation de Bid fait suite à une cascade de réactions impliquant les récepteurs de morts et son activation par la Caspase 8, tandis que l'activation de Bim fait suite à divers stress, tels que le stress du réticulum endoplasmique (RE), le retrait des cytokines ou le traitement aux glucocorticoïdes [182] (pour revue). Ceci peut suggérer que différentes voies d'activation de l'apoptose conduisent à différents modes d'activation de Bax.

Sur la base de ces données l'équipe de Gavathiotis a développé une molécule, le BTSA1, qui active Bax en se liant avec une affinité et une spécificité élevées au même site d'activation que Bim précédemment décrit. BTSA1 est efficace pour inhiber la croissance de xénogreffes de leucémie myéloïde aiguë (LMA) humaine, et pour augmenter la survie de l'hôte sans toxicité [183]. Ceci montre que l'inhibition des protéines anti-apoptotiques par les BH3-mimétiques n'est pas la seule voie efficace de traitement des cancers *via* les protéines de la famille de Bcl-2: en effet, l'activation directe des protéines pro-apoptotiques, telles que Bax, est une alternative possible et crédible [184] (pour revue).

L'activation indirecte : Elle consiste à déplacer l'interaction entre Bax et ses partenaires anti-apoptotiques, notamment Bcl-2 et Bcl-xL. Ce déplacement est en général effectué par les protéines à BH3 seulement sensibilisatrices. Les protéines anti-apoptotiques présentent une meilleure affinité pour les domaines BH3 des protéines à BH3-seulement, que pour celui de de Bax. Ceci permet d'expliquer pourquoi ces protéines à BH3-seulement déplacent Bax de son interaction avec Bcl-2 ou Bcl-xL [185], [186]. Cette propriété est la base du mode d'action des molécules BH3-mimétiques, capables de déplacer Bax de son interaction avec Bcl-2 et/ou Bcl-xL [101] (pour revue).

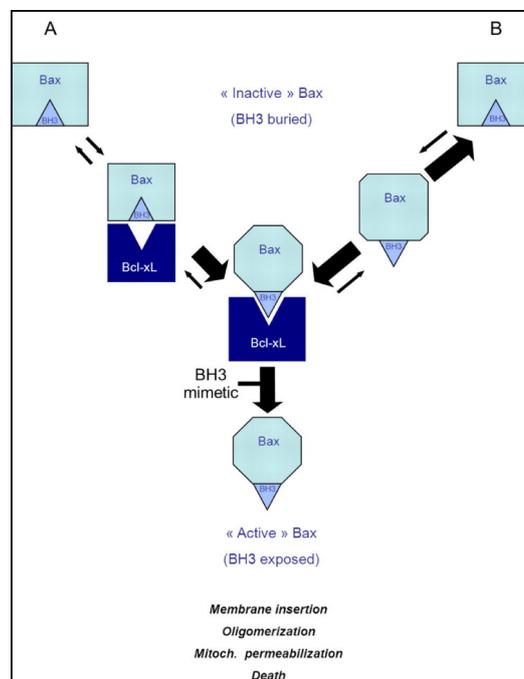


Figure 23 – mode d'activation indirect de Bax par Bcl-xL mettant en évidence l'effet des BH3 mimétiques Gautier et al (2011)

Suite au déplacement de son interaction avec Bcl-xL, Bax acquiert une conformation qui expose son domaine BH3 et est capable de se relocaliser vers la MOM pour provoquer la libération du cytochrome c [187] (**fig 23**). Ceci montre que l'interaction Bax/Bcl-xL induit l'amorçage de Bax. Cette observation présente un intérêt particulier dans les cellules cancéreuses qui surexpriment Bcl-xL, dans lesquelles Bax présenterait alors une conformation amorcée, favorisant l'efficacité des molécules BH3-mimétiques pour déclencher l'apoptose.

2.2.2. Oligomérisation et perméabilisation de la MOM

Initialement, la libération du cytochrome c a été attribuée à l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) [68]. Cependant, les données les plus récentes ont montré l'implication du PTP non pas dans l'apoptose, mais dans la nécroptose [70], [69].

Il a été montré que la libération des facteurs apoptogènes tel que le cytochrome c est associée à la formation d'un canal de grande taille, appelé MAC (Mitochondria Apoptosis- induced Channel) dans la membrane mitochondriale externe [188], [189].

L'implication directe de Bax dans le relargage du cytochrome c a été mise en évidence par Manon et al. Ils ont montré que l'expression hétérologue de Bax dans la levure entraîne un arrêt de la croissance de levure qui est couplé à une diminution de la quantité de cytochrome c mitochondrial. Ce processus a été prévenu par la co-expression de Bax et Bcl-xL [190]. Des résultats similaires ont été également observés chez les mammifères [191]. Des études électrophysiologiques sur des mitochondries isolées à partir de cellules traitées à la staurosporine ont apporté la preuve directe que l'oligomère de Bax est un composant du canal MAC [189].

La question de savoir la séquentialité entre l'insertion et l'oligomérisation de Bax dans la MOM reste très débattue. Deux modèles coexistent dans la littérature (**fig 24**).

Dans le modèle classique, Bax est transloqué vers la mitochondrie en tant que monomère. Trois de ses hélices sont insérées ; l'hélice $\alpha 9$ et les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ qui s'insèrent sous forme d'une structure organisée en épingle à cheveux [192].

En supposant un modèle de pore formé uniquement par l'insertion des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$, Martinez-Caballero et al ont montré que le canal MAC contient environ neuf monomères de Bax. Les données d'électrophysiologie ont montré que la taille maximale du canal obtenue dans ce travail est entre 5,5 et 6nm de diamètre [193].

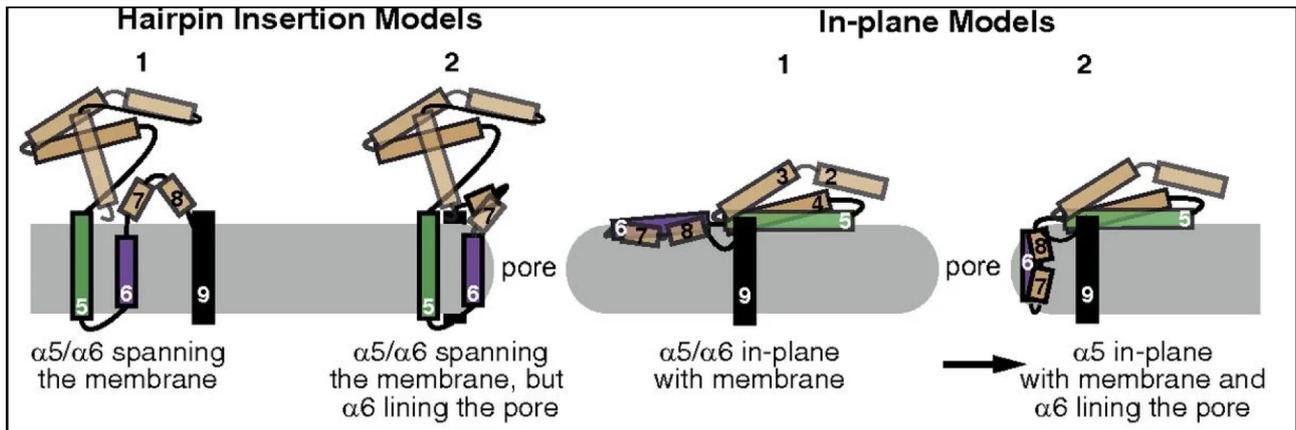


Figure 24 – modèles d’insertion de Bax dans la MOM

A gauche, le modèle basé sur l’insertion de l’épingle à cheveux $\alpha 5$ - $\alpha 6$; A droite, le modèle basé sur l’ouverture de l’épingle à cheveux [194].

Le second modèle est basé sur les données de cristallographie de Bax ΔC en présence de BidBH3 ; elles mettent en évidence un modèle d'ouverture de l'épingle à cheveux $\alpha 5$ et $\alpha 6$ (**fig 21C**) [179]. Des expériences de DEER (Double Electron Electron Resonance spectroscopy) soutiennent également ce modèle : en effet, Bleicken et al ont observé une augmentation de distances entre deux résidus situés dans les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ lorsque Bax est inséré dans des liposomes. Ils ont proposé un modèle où l'hélice $\alpha 9$ est insérée et les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ sont posées à plat sur la membrane [195]. Sur la base de ces données, des modèles de pores de grandes tailles ont été proposés [196] (pour revue).

Cette revue non exhaustive montre que les mécanismes qui sous-tendent l'insertion de Bax dans un environnement membranaire restent débattus. Les données de Suzuki et al ont montré que la configuration unique de Bax consistant à stabiliser son hélice $\alpha 9$ dans le sillon rend difficile le déplacement de cette hélice par les protéines à BH3 seulement activatrices sans apport supplémentaire d'énergie [118]. D'après les données de Sung et al et Garner et al, l'ajout de peptides BH3 pour l'activation de Bax dans un système *in vitro* sans apport d'énergie conduit à la formation d'agrégats de Bax pouvant perméabiliser les membranes [197] [153]. Ceci suggère une incapacité de ces peptides BH3 à déplacer l'hélice $\alpha 9$ de Bax de son sillon hydrophobe. Cependant, le retrait de cette hélice empêche la formation de tels agrégats après l'ajout des peptides BH3, suggérant que l'hélice est responsable de la formation de ces agrégats et donc que les peptides BH3 peuvent bel et bien déplacer cette hélice du sillon. Ceci complexifie la compréhension des mécanismes sous-tendant l'activation de Bax, en l'occurrence ceux expliquant comment l'hélice $\alpha 9$ de Bax est délogée de son sillon hydrophobe [198] (pour revue).

Dans ce travail nous apportons des données supplémentaires permettant de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la translocation et l'insertion de Bax et comment le délogement de son hélice $\alpha 9$ est initié et régulé.

V. Démarche expérimentale

Les données de la littérature suggèrent que la translocation, l'insertion et l'oligomérisation de Bax dans la MOM est un processus multi-étapes. Dans le but d'élucider les mécanismes impliqués, nous avons développé une approche *in vitro*, basé sur un système minimaliste que nous pouvons complexifier progressivement. Cette approche consiste à utiliser un système de synthèse protéique «cell-free» en présence d'un modèle membranaire simple, les nanodisques.

1. Le système de synthèse protéique «cell-free»

Le système de synthèse protéique "cell-free" est un système couplé de transcription et traduction permettant la production des protéines à grande échelle dans un environnement acellulaire [199]. Le principe est basé sur l'utilisation de la machinerie de traduction extraite des cellules. La transcription peut être assurée par la polymérase endogène provenant de l'extrait cellulaire, mais en général, l'utilisation d'une polymérase exogène est recommandée pour la spécificité entre cette dernière et le promoteur dans le vecteur encodant la protéine d'intérêt (la T7 RNA polymérase est la plus fréquente). Un système de régénération de l'ATP, permet de maintenir le système autosuffisant en énergie, le couple pyruvate kinase/phosphoenolpyruvate est le plus fréquent.

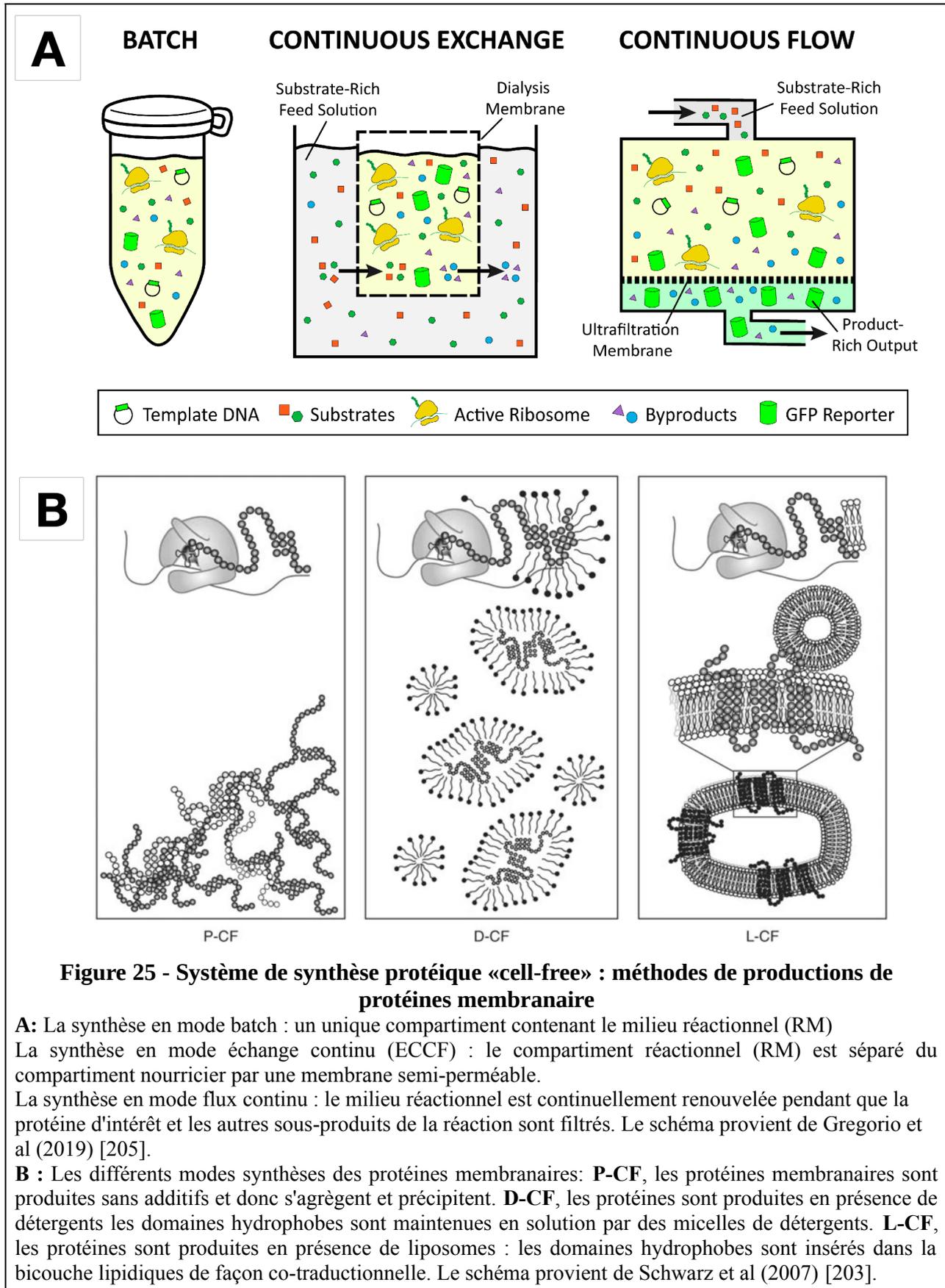
Les extraits peuvent provenir de plusieurs types cellulaires (procaryotes comme eucaryotes).

Par exemple, Madin et al ont décrit un système basé sur l'extrait d'embryons de blé. Les meilleurs rendements de production, entre 1 à 4mg de protéines (60h de production en échange continu) ont été obtenus en utilisant des embryons dépourvus d'inhibiteurs de traduction [200].

Le système le plus courant est celui basé sur l'extrait d' *E.coli*, dont les rendements peuvent aller jusqu'à 6mg/mL en utilisant le couple créatine kinase/ créatine phosphate comme système de régénération de l'ATP [201].

Ce système représente un avantage considérable en protéomique, permettant de réaliser des tests de synthèse à grande échelle dans des systèmes High throughput, notamment dû à la capacité à utiliser l'énergie du système à la production exclusive de la protéine d'intérêt. Un autre avantage du système est la production de protéines comportant des acides aminés non naturels (sélénocystéine par exemple) ou des protéines marquées par des isotopes stables ¹³C/¹⁵N pour des études de RMN [202].

L'un des avantages qui nous intéresse dans ce travail est la capacité à pouvoir synthétiser les protéines membranaires directement en présence d'agents de solubilisation (détergent, surfactant) ou d'agents mimant la membrane (liposomes, nanodisques) (**fig 25B**) [203], [204].



Trois modes de production dans le système de synthèse cell-free ont été décrits [205], [203]:

(i) la synthèse en mode batch (**fig 25A**) : dans ce système, la synthèse se déroule dans un unique compartiment. Ainsi l'extrait cellulaire, les métabolites nécessaires à la production des protéines ainsi que les sous-produits issus de l'activité de synthèse sont concentrés dans ce seul compartiment. Cette configuration limite le rendement de production car des sous-produits de production comme le phosphate inorganique par exemple, peut, en s'accumulant, complexer les cations divalents nécessaires au fonctionnement des enzymes.

(ii) Le mode de synthèse en échange continu (**fig 25A**) : contrairement au mode batch qui ne comporte qu'un compartiment (le compartiment réactionnel, RM), ce système est constitué de deux compartiments séparés l'un de l'autre par une membrane semi-perméable. Un compartiment qui contient le milieu réactionnel (RM) où se déroule la synthèse des protéines, et un compartiment qui contient le milieu nourricier (FM). Le principe repose sur l'échange entre les deux compartiments, les métabolites nécessaires à la synthèse sont continuellement renouvelés et les sous-produits de la synthèse sont éliminés dans le FM. Le rapport en volume entre le RM et le FM est en général de 1 : 10 ou 1 : 30.

(iii) Le mode de synthèse en flux continu (**fig 25A**) : dans ce mode, le milieu réactionnel est placé dans un compartiment séparé d'un compartiment de récolte par une membrane d'ultrafiltration. Une valve en amont du compartiment réactionnel permet de pomper en continu la solution nourricière dans le milieu réactionnel. La protéine d'intérêt et les sous-produits sont filtrés.

Dans notre étude le protocole de synthèse en mode échange continu décrit par Schwarz et al a été utilisé [203].

Bax avait été précédemment synthétisé dans le système «cell-free» en présence de détergent ou de surfactant polyfluorés et purifié grâce à une étiquette histidine [165]. Les deux variants de Bax produits, Bax WT et Bax P168A, conservaient les propriétés biochimiques précédemment décrites *in cellulo*.

2. Les nanodisques comme outils d'étude des protéines membranaires

Au niveau moléculaire, la description des rôles et mécanismes d'action des protéines nécessite l'obtention de données structurales. Les protéines membranaires possèdent des domaines hydrophobes qui sont responsables de leurs agrégations hors de l'environnement membranaire. Pour les purifier en vue d'études structurales, un défi majeur consiste à maintenir leurs caractéristiques structurales en dehors de leur environnement natif. Les procédés utilisés pour étudier ces protéines consistent en l'utilisation des agents de solubilisation (détergents, surfactants, amphipols) pour les maintenir en solution, ou à les reconstituer dans des environnements membranaires *in vitro* (liposomes, nanodisques, etc.) [206] (pour revue).

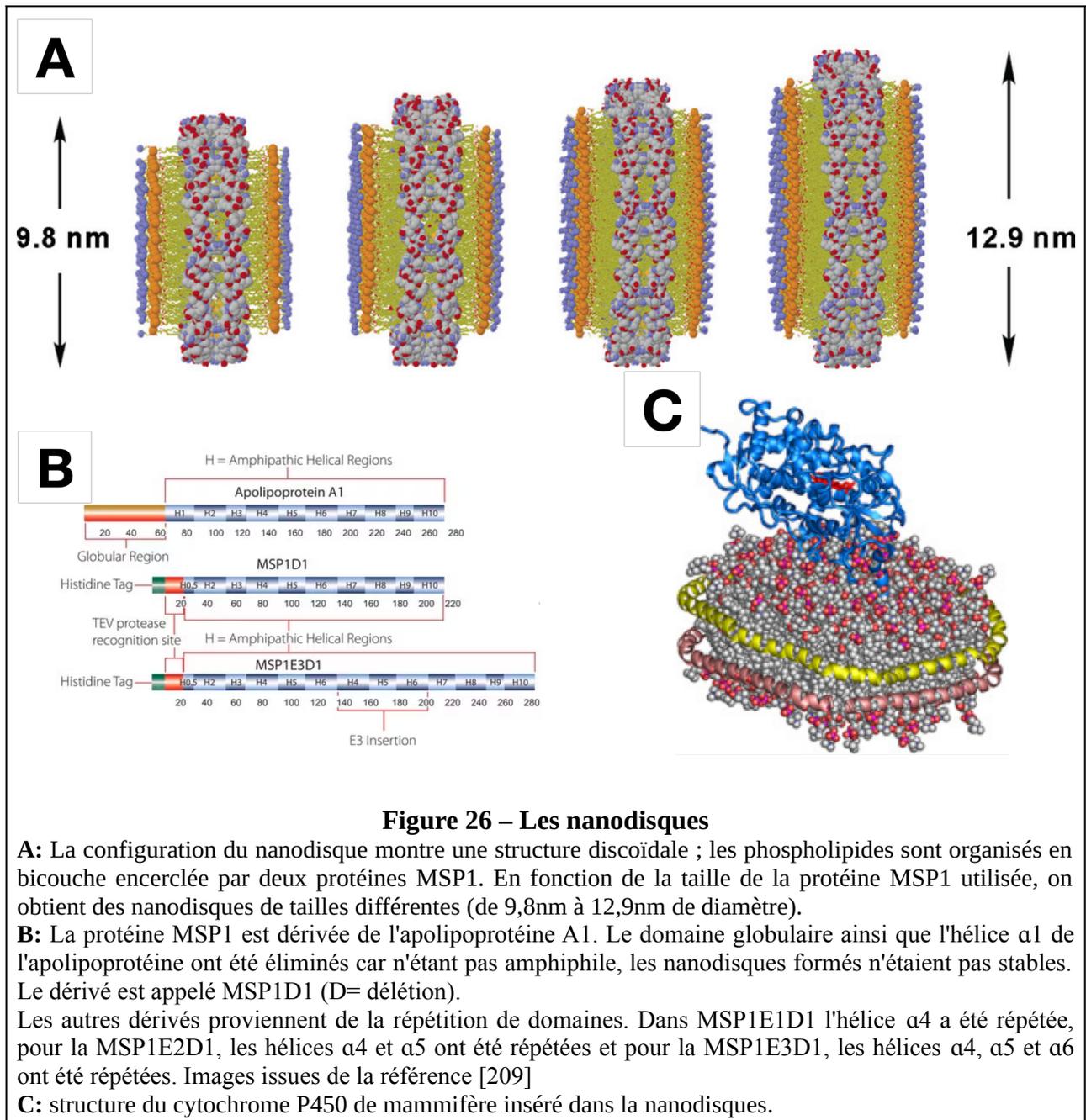
Le procédé le plus couramment utilisé pour extraire ces protéines est la solubilisation par des détergents. Les caractéristiques physico-chimiques des détergents étant fondamentalement différentes de celles des bicouches lipidiques, il est donc difficile de garantir que la structure de la protéine dans son environnement natif soit maintenue en détergent [207] (pour revue).

La reconstitution dans des environnements membranaires artificiels est donc un moyen efficace de purifier la protéine tout en maintenant une conformation proche de celle de son environnement natif.

Les liposomes en sont un exemple. Ce sont des vésicules formées par une bicouche lipidique. Ils délimitent un compartiment aqueux, l'espace intraliposomal ce qui leur confère un avantage pour des études fonctionnelles telles que la mesure de l'activité des canaux ioniques. Cependant, les liposomes sont fortement soumis au phénomène de coalescence ce qui est à l'origine d'hétérogénéité limitant les études structurales .

Les nanodisques ont émergé récemment comme un outil permettant aussi bien les études structurales que fonctionnelles des protéines membranaires. Les nanodisques sont des bicouches lipidiques de forme discoïdale qui sont stabilisés par un dimère de la protéine d'échafaudage des membranes, MSP (Membrane Scaffold protein) (**fig 26A**) [208]. La protéine MSP est dérivée de l'apolipoprotéine A1 qui est une protéine structurée en hélices α amphiphiles. Cette structure lui offre la possibilité de former des complexes avec les lipides et des dérivés du cholestérol formant ainsi des complexes lipoprotéiques solubles de haute densité (LDH). En utilisant l'apolipoprotéine A1 humaine, Denisov et al ont conçu des dérivés MSP1 de différentes tailles. L'utilisation de ces variants de la MSP permet de former des nanodisques monodisperse de tailles allant de 9,8nm à 12,9nm de diamètre (**fig 26B**) [209].

Le principe de la formation des nanodisques est basé sur la nature amphiphile des structures hélicoïdales de la MSP1. On part d'une micelle mixte phospholipides/détergents et, à mesure que les détergents sont retirés, les phospholipides s'organisent en bicouche dont les zones hydrophobes sont stabilisées par une unité de deux protéines MSP. C'est donc un processus d'autoassemblage. La particule lipidique qui en résulte est soluble, et présente l'avantage d'être purifiable par des techniques de chromatographie *via* l'étiquetage de la protéine MSP1 [210] (pour revue). De plus, la composition lipidique peut être entièrement contrôlée, permettant ainsi de réaliser des études fonctionnelles de ciblage.



Les nanodisques représentent des outils adéquats pour les études structurales des protéines membranaires. Par exemple, la structure d'un cytochrome P450 de mammifère a été une des premières structures résolue grâce aux nanodisques (**fig 26C**) [208]. Un autre exemple récent est la résolution par cryo-microscopie électronique de la structure du récepteur de l'inositol 1,4,5 triphosphate [211], [210](pour revue).

La reconstitution des protéines membranaires dans les nanodisques passe en général par une étape de purification de la protéine en détergents. Pour éviter cette étape, récemment, des copolymères amphiphiles de Styrene-maleic acide (SMA) ont été développés. Ces polymères ont la capacité de s'intégrer dans les membranes biologiques et de les solubiliser, formant ainsi des disques d'environ 10nm de diamètre isolant les protéines membranaires dans leur environnement natif nommé SMALP (SMA Lipid particle) [212] (pour revue).

L'utilisation des nanodisques et des SMALP associées aux progrès de la cryo-EM a permis de résoudre des dizaines de structures de protéines membranaires auxquelles on n'avait pas accès par les approches classiques de cristallisation/diffraction des rayons X et de RMN sur des protéines solubilisées en détergents.

Si les nanodisques ont eu beaucoup d'intérêt dans la résolution de structures des protéines membranaires, ils sont également utilisés pour des études fonctionnelles [213] (pour revue). Dans ces études, effectuées sur des protéines solubilisées et reconstituées en nanodisques, diverses approches biochimiques ont permis d'identifier des propriétés fonctionnelles mal décrites sur des protéines natives (par exemple degré d'oligomérisation de la protéine active) [214].

Des auteurs ont combiné la synthèse de protéines en «cell-free» et l'utilisation des nanodisques de façon à obtenir des protéines insérées spontanément sans passer par une étape de solubilisation et reconstitution [215], [216].

Dans ce travail, nous avons combiné la synthèse de Bax en «cell-free» et l'utilisation des nanodisques dans le but d'obtenir des nanodisques contenant des oligomères natifs de Bax en vue d'études structurales. Cependant cette approche n'a pas fonctionné. Nous avons essayé d'en comprendre la raison, ce qui nous a conduit à étudier les mécanismes moléculaires sous-tendant l'insertion de Bax dans la bicouche lipidique et la régulation de ce processus par certains de ses partenaires.

Résultats

**1ère Partie. Mécanismes moléculaire de la translocation,
de l'insertion et de l'activation de Bax dans les
nanodisques**

I. Etude des changements conformationnels induits par l'interaction entre Bax et une bicouche lipidique

1. Contexte et historique

Dans l'optique d'acquérir des données structurales sur la forme oligomérique de Bax insérée dans un environnement membranaire, notre équipe a initié, avant mon arrivée au laboratoire, la production de Bax dans un système de synthèse «cell-free». L'un des avantages majeurs qu'offre ce système est la possibilité de produire la protéine d'intérêt directement en présence d'agents mimant l'environnement membranaire. Parmi ces agents, les nanodisques présentent l'avantage de reproduire fidèlement les propriétés des membranes biologiques en plus d'être facilement purifiables par des techniques de chromatographie. Cette étude a été initiée par **Cécile Gonzalez** et **Stéphen Manon**.

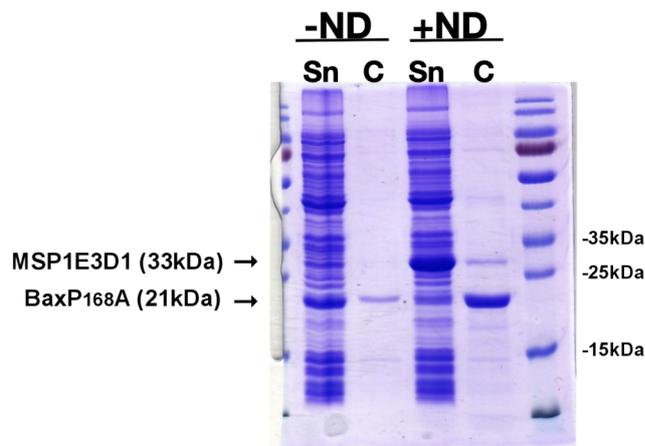


Figure 27 - synthèse de Bax en «cell-free» en présence de nanodisques

Le mutant Bax-P168A (constitutivement mitochondrial et actif *in cellulo*) a été produit en Cell-free en absence ou en présence de nanodisques (ND). Après centrifugation (20000 x g), les fractions culot (C) et surnageant (Sn) ont été analysées par SDS-PAGE, et révélation au bleu de Coomassie. En absence de ND (-ND) Bax est en majorité présente dans la fraction Sn. En présence de ND (+ND), le mutant Bax-P168A est en majorité précipité dans le culot, la protéine d'échafaudage des ND est présente dans le Sn, montrant que les nanodisques restent bien dans la fraction soluble.

Un mutant de Bax constitutivement membranaire et actif *in cellulo* a été produit en «cell-free» en absence ou en présence de nanodisques. Les milieux réactionnels de synthèse ont été centrifugés afin de séparer les protéines précipitées et les protéines solubles. Cette centrifugation a généré deux fractions (**fig 27**):

-Le culot (**C**) qui contient toutes les protéines précipitées, donc non soluble dans le milieu réactionnel.

-Le surnageant (**Sn**) qui contient toutes les protéines solubles ainsi que les nanodisques.

De façon très inattendue, il a été observé qu'entre 50 et 80% de la protéine Bax est précipitée dans le culot, uniquement lorsque les nanodisques sont présents dans le milieu réactionnel de production. En leur absence, la protéine demeure parfaitement soluble. De plus, la protéine Bax est la seule protéine précipitée dans ces conditions; les nanodisques demeurent solubles dans le surnageant. Durant mes stages de Master I et II sous la tutelle de **Cécile Gonzalez** puis de **Stéphen Manon** respectivement, nous avons déterminé les conditions optimales pour la resolubilisation du culot de Bax et la reconstitution de ce dernier dans les nanodisques. En faisant l'expérimentation inverse, c'est à dire en formant des nanodisques en présence de Bax resolubilisée, nous avons réussi à reconstituer des nanodisques contenant Bax oligomérique. Cette partie a fait l'objet d'une première publication [217]. Nous en discuterons plus en détail dans la deuxième partie de ce manuscrit.

Les protéines de la famille de Bcl-2 sont au cœur de la voie mitochondriale de l'apoptose. Par conséquent, ces dernières ont fait l'objet de nombreuses études qui ont mené à une meilleure compréhension de leurs mécanismes d'action. Parmi les membres pro-apoptotiques (Bax, Bak et Bok), Bax est de loin la plus exprimée dans la plupart des cellules [137]. De plus Bax est majoritairement cytosolique dans les cellules saines [116], tandis que Bak est constitutivement mitochondriale [120], et Bok est majoritairement distribuée dans le RE et l'appareil de Golgi [74]. Bax doit donc subir un changement conformationnel pour être transloquée vers la MOM, s'y insérer, s'oligomériser et finalement la perméabiliser aux facteurs apoptogènes. Pour toutes ces raisons, Bax demeure le membre pro-apoptotique le plus étudié. Cependant, jusqu'à présent, les mécanismes qui sous-tendent la translocation, l'insertion et l'oligomérisation de Bax dans la MOM ne sont pas totalement élucidés.

Dans notre système *in vitro*, Bax exhibe un comportement intrigant en présence d'un environnement membranaire. En effet, le fait que la précipitation de Bax n'ait lieu qu'en présence de nanodisques (**fig 27**) suggère que Bax interagit avec ces derniers. Cette interaction aboutit à un échec d'insertion de la protéine dans le nanodisque, suivi de sa précipitation.

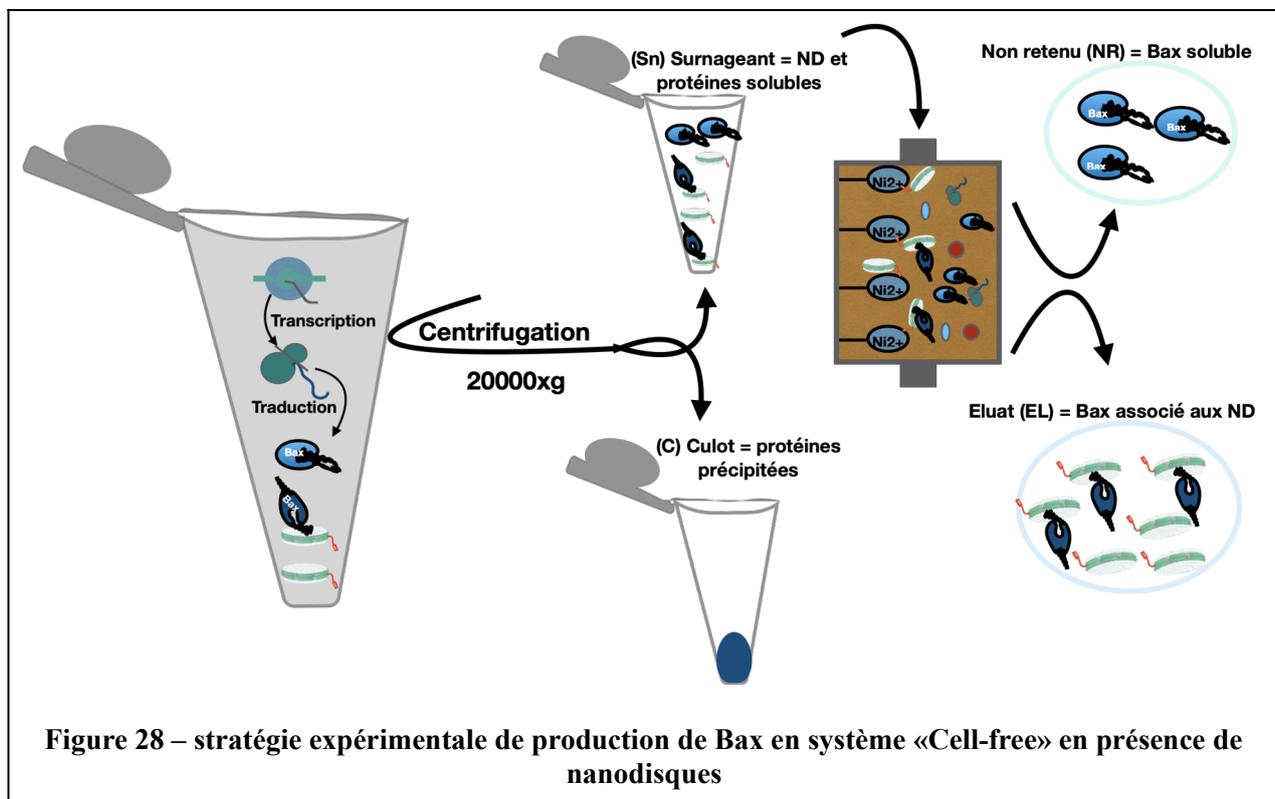
Dans ce premier chapitre nous allons décrire les mécanismes qui sous-tendent la précipitation de Bax lorsqu'elle est produite dans un système de synthèse «cell-free» en présence de nanodisques. L'étude de ce processus permettra de décrire les interactions entre Bax et une bicouche lipidique, et ainsi de comprendre les mécanismes qui sous-tendent la translocation et l'insertion de Bax dans un environnement membranaire.

L'approche *in vitro* basée sur le système de synthèse protéique «cell-free» que nous avons utilisée pour étudier le comportement de Bax en présence d'un environnement membranaire est commune à toutes les expériences qui suivent. Nous allons donc donner ici une brève description du protocole.

2. Démarche expérimentale

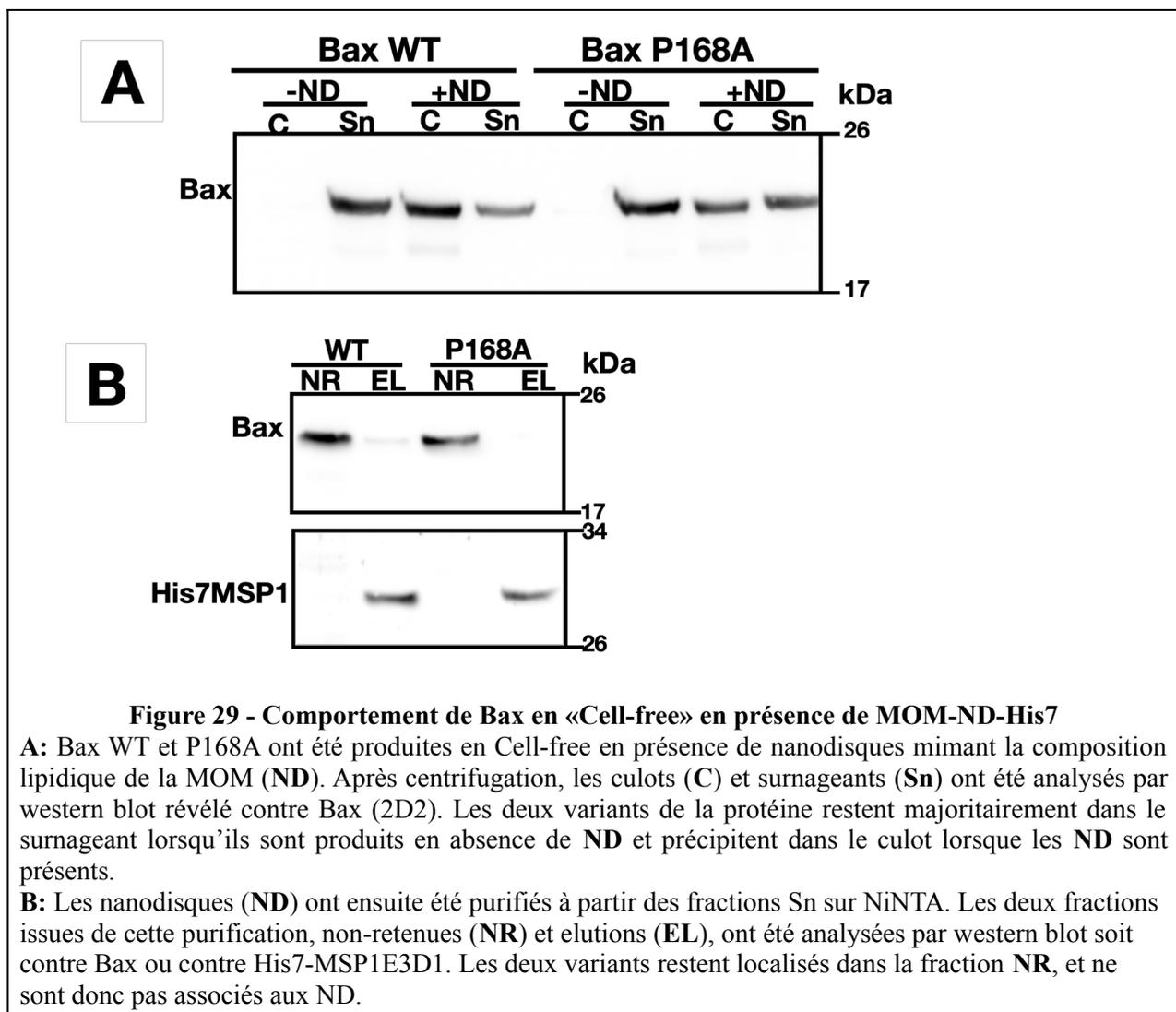
Bax est produite dans le système «cell-free» en présence de nanodisques dont la bicouche mime la composition de la membrane externe mitochondriale (MOM-ND-His7) [84]. Les milieux réactionnels (RM) ont été centrifugés pour séparer les protéines solubles (fraction Sn) des protéines précipitées (fraction C). Les nanodisques étant solubles, ils restent dans la fraction Sn. La protéine d'échafaudage porte une étiquette His₇ permettant la purification des nanodisques sur une colonne de Ni-NTA. A l'issue de cette étape de purification, deux fractions sont obtenues:

- La fraction non retenue (NR) contenant toutes les protéines non associées aux nanodisques (Bax soluble).
- La fraction éluat (EL) contenant des nanodisques, soit vides, soit co-purifiés avec Bax. Ces fractions sont analysées par western blot, révélaté soit contre Bax soit contre His7-MSP1E3D1 (**fig 28**).



3. Bax WT et Bax P168A néosynthétisées ne s'insèrent pas spontanément dans les nanodisques

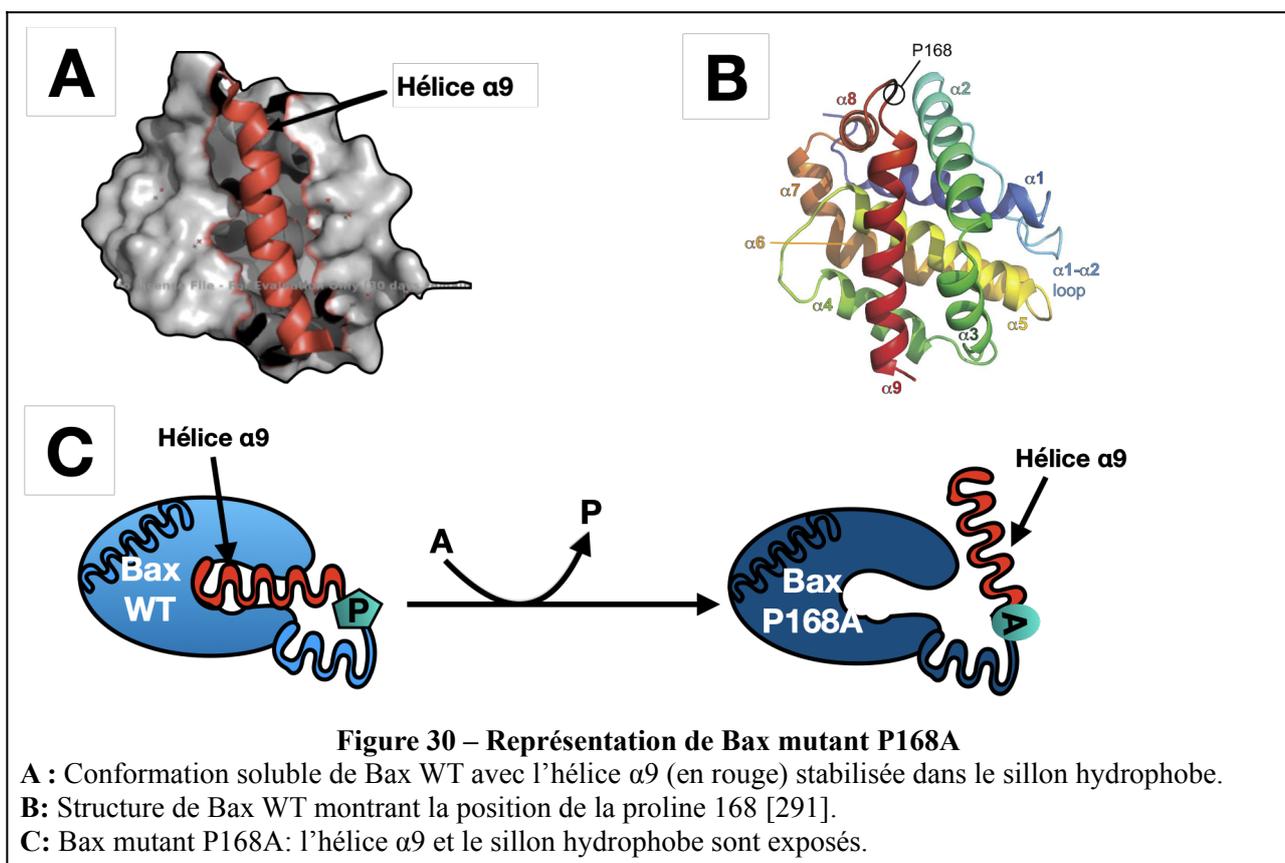
In cellulo, la protéine Bax sauvage est majoritairement cytosolique et soluble, mais peut être également associée aux membranes MOM et RE de façon périphérique [166]. Pour tester l'hypothèse d'une insertion spontanée de Bax dans un environnement membranaire, Bax WT et un mutant constitutivement mitochondrial et actif dans des glioblastomes humains [164] et dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* [155], Bax P168A, ont été produits en système de synthèse «cell-free» en présence de nanodisques. En effet, ces études ont montré que la mutation de la proline 168 située dans la boucle entre les hélices $\alpha 8$ et $\alpha 9$ en alanine était suffisante pour adresser constitutivement Bax à la MOM.



Nous avons observé qu'en absence de nanodisques, Bax WT et le mutant P168A sont majoritairement solubles (**fig 29A**). L'ajout de nanodisques dans le milieu réactionnel entraîne la

précipitation d'une grande partie des deux variants de la protéine dans le culot (**fig 29A**). Ceci suggère que les deux variants de Bax interagissent avec les nanodisques, et que cette interaction entraîne la perte de leur solubilité. On peut émettre l'hypothèse que les nanodisques induisent un changement conformationnel de Bax provoquant vraisemblablement l'exposition de parties hydrophobes de la protéine entraînant ainsi sa précipitation. Néanmoins, une partie non négligeable des deux variants de la protéine reste soluble dans le surnageant (**fig 29A**).

Après purification des nanodisques contenus dans les surnageants, nous avons observé que Bax WT et le mutant P168A sont majoritairement trouvés dans les fractions non-retenues (NR), indiquant qu'ils ne sont pas co-purifiés avec les nanodisques (**fig 29B**).



Il est intéressant de noter que le mutant P168A (constitutivement mitochondrial et actif contrairement à Bax WT) [155], se comporte comme Bax WT dans notre système *in vitro*.

Selon la structure de Bax WT décrite par Suzuki et al (2000) [118], l'hélice hydrophobe $\alpha 9$ de Bax est stabilisée dans un sillon hydrophobe formée par le reste de protéine (**fig 30A**). La présence de la proline (P168) au début de cette hélice $\alpha 9$ favoriserait son rapprochement vers la poche hydrophobe permettant ainsi de stabiliser la forme soluble de la protéine (**fig 30B**) [118].

Cartron et al (2005) et Arokium et al ont montré que Bax P168A est constitutivement mitochondrial et actif quand il est surexprimé dans des glioblastomes humains ou exprimé de façon hétérologue

dans la levure [164] [155]. Selon Simonyan et al [165], le mutant Bax P168A est également capable de perméabiliser des LUVs de façon significativement plus efficace que Bax^{WT}. Ces auteurs ont donc proposé que la transition *cis-trans* de cette proline permettait d'éloigner l'hélice α_9 du cœur de la protéine, favorisant ainsi l'exposition des parties hydrophobes de Bax (Lalier et al., 2007) [218]. Cette transition est lente pour la proline, mais elle peut-être catalysée par des peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérases, telles que la protéine Pin1 [219]. La mutation de cette proline en alanine accélère la transition et donc permet de passer facilement à la position ouverte où l'hélice α_9 est éloignée du sillon hydrophobe (**fig 30C**).

Cependant l'implication de cette proline dans l'adressage et l'insertion de Bax dans la MOM reste controversée. Schinzel et al (2004) ont observé que Bax Δ P168 et P168A sont cytosoliques dans des cellules de mammifères (HeLa et HEK293) [166]. D'autre part, un mutant BaxP168G a été montré comme formant un dimère inactif dans le cytosol de cellules MEF [153].

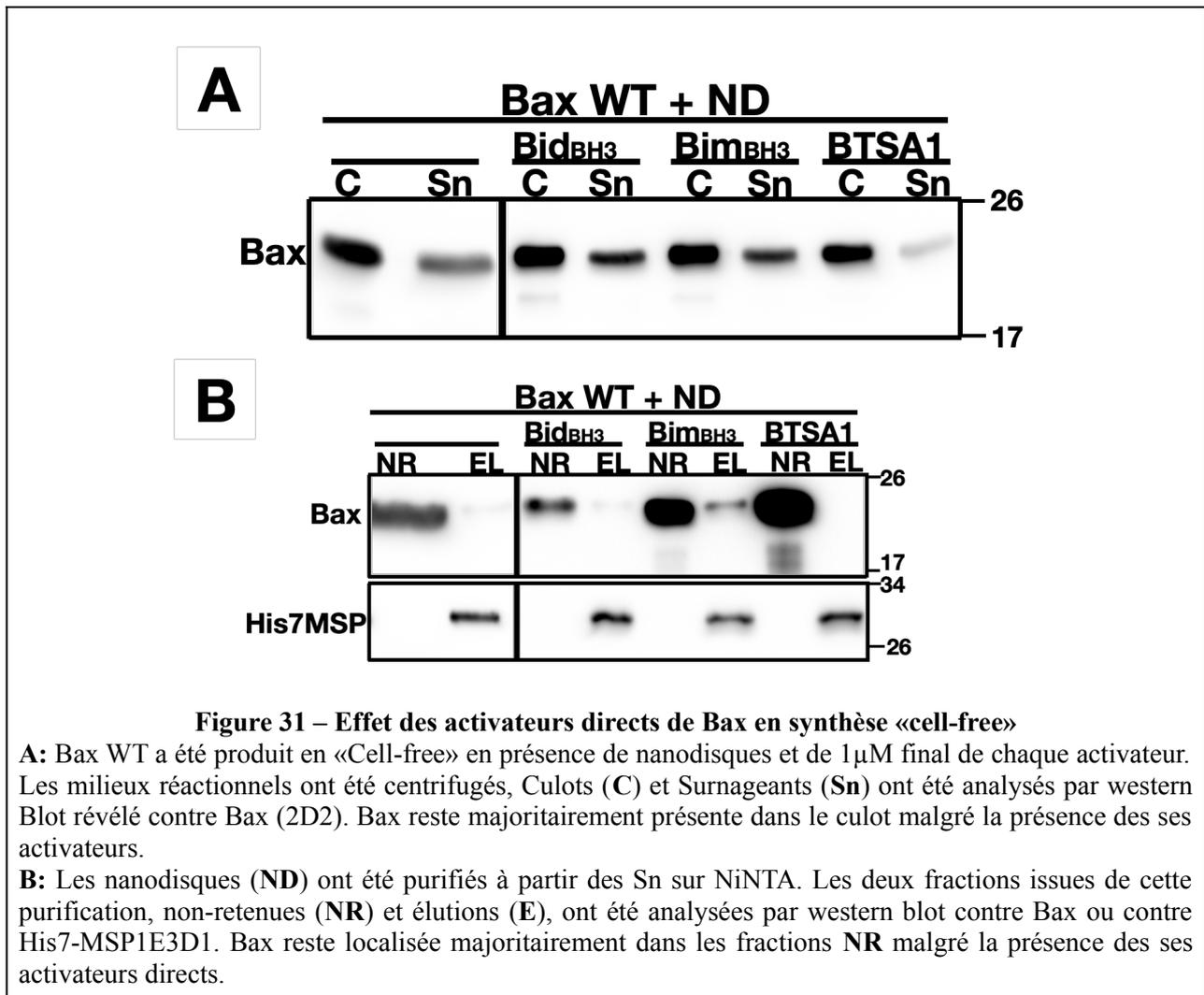
La question est donc de savoir si ce mutant peut-être considéré comme actif. Il est possible que le changement de conformation de Bax du côté C-terminal ne soit pas suffisant pour permettre la translocation et l'association de Bax avec les nanodisques dans notre système *in vitro*. En effet, il a été récemment montré que la mutation P168A ne permet pas la reconnaissance de Bax par un anticorps conformationnel 6A7, considéré comme spécifique du domaine N-terminal de Bax active. Ceci suggère que ce mutant ne subit pas de changement conformationnel du côté N-terminal [137]. Or, les activateurs directs de Bax, les protéines à domaines BH3 seulement (cBid ou PUMA) interagissent avec Bax *via* son hélice α_1 , notamment le résidu D33 (extrémité N-terminale) [127]. Pour vérifier ces hypothèses, nous nous sommes donc intéressés aux changements conformationnels de Bax ayant lieu du côté N-terminal.

4. Les activateurs directs de Bax (BidBH3, BimBH3 et BTS1) ne stimulent pas son insertion dans les nanodisques

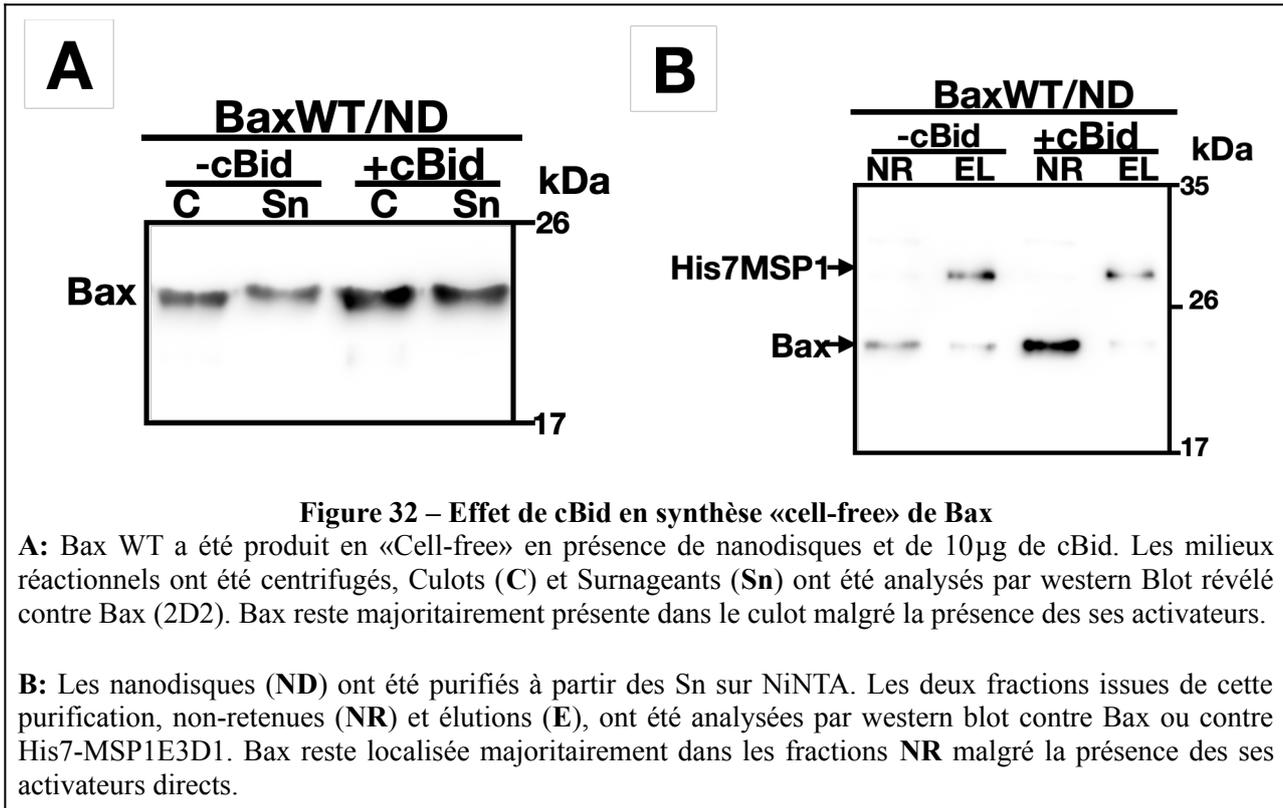
Les conditions physiologiques d'activation de Bax ont été largement décrites dans la littérature. Lorsque l'apoptose est initiée, les protéines à BH3 seulement tel que cBid, Bim ou PUMA agissent comme des activateurs directs qui vont initier le changement conformationnel nécessaire à l'insertion de Bax dans la MOM [220] [221] [222] [223] (pour revues). Après son insertion, Bax expose une partie de son extrémité N-terminale qui est alors reconnue par l'anticorps conformationnel 6A7. L'activation de Bax se fait *via* son interaction avec les domaines BH3 de certaines protéines à domaine BH3 seulement (cBid, Bim et PUMA). Ces connaissances ont permis de créer des molécules (certaines déjà utilisées en thérapie anticancéreuse) appelé BH3 mimétiques,

qui vont mimer l'action des domaines BH3 de ces protéines [24] [224] (pour revues). Si la plupart de ces molécules ont pour cible les membres anti-apoptotiques de la famille et inhibent l'interaction entre protéines pro- et anti-apoptotiques, certaines de ces molécules, telles que le BTSA1, ciblent directement la protéine Bax en provoquant son activation (Reyna et al., 2017)[183].

Nous avons réalisé la synthèse de Bax WT en présence de peptides recouvrant les domaines BH3 de Bid et Bim, ou de la molécule BTSA1.



Il peut être observé dans la **figure 31A** que la présence de ces différents activateurs directs de Bax n'est pas suffisante pour prévenir la précipitation de Bax causée par la présence de nanodisques dans le milieu réactionnel. De plus, la purification des nanodisques montre qu'en présence de ces activateurs, Bax n'est toujours pas co-purifiée avec les nanodisques (**fig 31B**).



Il a été montré que la structure hélicoïdale des peptides BH3 peut être instable en solution [180]. Nous avons donc testé l'effet de la protéine Bid activée par la caspase 8 (cBid). Nous avons observé des résultats similaires à ceux obtenus avec les peptides BH3 (**fig 32A et B**).

En conclusion de ces expériences, on peut émettre l'hypothèse que les nanodisques confèrent à Bax une conformation qui rend inaccessible le site d'action des activateurs. Nous nous sommes donc intéressés à l'action des nanodisques sur la conformation de Bax dans notre système *in vitro*.

5. La bicouche lipidique induit un changement conformationnel de Bax

La précipitation de Bax lors de la production en «cell-free» n'a lieu que si la protéine est produite en présence de nanodisques. En leur absence, la protéine demeure soluble (**fig 27**), ce qui est cohérent avec le comportement de Bax WT *in cellulo*.

Les travaux de Yethon et al ont montré que la présence d'une bicouche lipidique (liposomes) était suffisante pour entraîner l'exposition transitoire de l'extrémité N-terminale de Bax (ART), reconnue par l'anticorps conformationnel 6A7 (**fig 33A**), et ce indépendamment de la composition lipidique des liposomes [174]. Cette observation nous a fourni une hypothèse plausible pour expliquer l'effet des nanodisques sur la précipitation de Bax.

Afin de tester cette hypothèse, Bax WT a été produite en «cell-free» en absence de nanodisques, puis immunoprécipitée avec l'anticorps conformationnel 6A7 en présence ou en absence de nanodisques.

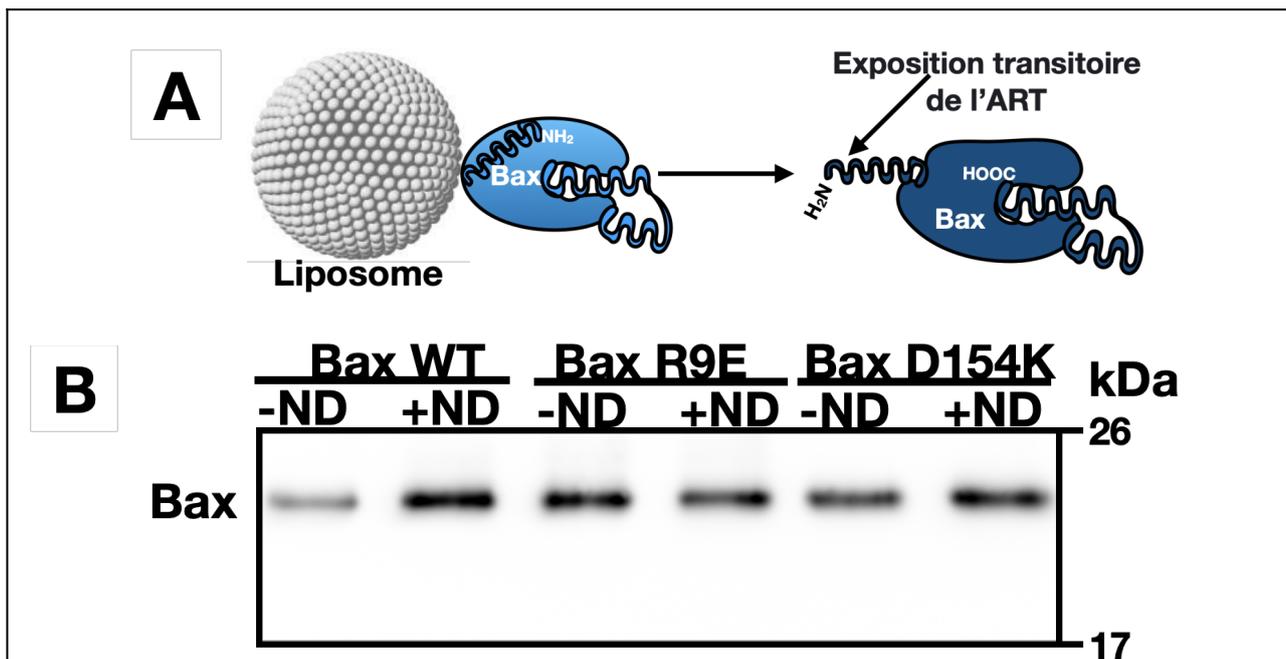


Figure 33 – La bicouche lipidique induit un changement conformationnel de Bax

A: représentation schématique des résultats de Yethon et al (2003) [174] montrant que lorsque Bax est incubée avec des liposomes, elle expose son ART qui est normalement peu accessible.

B: Bax a été produite en «Cell-free» en absence de nanodisques. Après centrifugation, une immunoprécipitation a été réalisée sur le surnageant avec l'anticorps 6A7 en absence ou en présence de nanodisques. En contrôle, deux mutants de Bax, R9E et D154K décrits par Arokium et al [157] comme présentant un ART constitutivement exposé, ont été testés dans les mêmes conditions.

La **figure 33B** montre que, en présence de nanodisques, la quantité de Bax immunoprécipitée par l'anticorps 6A7 augmente. Ceci est cohérent avec les observations de Yethon et al [174], et soutient

l'hypothèse selon laquelle la bicouche lipidique des nanodisques induit un changement conformationnel de la protéine Bax du côté N-terminal.

L'épitope de l'anticorps monoclonal 6A7 est formé des résidus 13–19 (PTSSEQI). Ces derniers sont associés au noyau globulaire dans la forme soluble de la protéine [173]. Leur exposition est corrélée au changement conformationnel entraînant l'insertion de Bax dans la MOM.

Cet épitope se trouve dans le domaine N-terminal de Bax, formé des résidus 1-19, qui apparaît non structuré en RMN (Suzuki et al 2000) [118]. Cette zone a été appelée ART (Apoptosis Regulation of Targeting) par Goping et al (1998) [150] qui ont montré que ce domaine régule la translocation de Bax dans la MOM. Le mutant Bax Δ ART généré dans leur travail était constitutivement inséré dans la MOM et relarguait le cytochrome c. Cartron et al (2002) ont montré l'existence d'un variant naturel de Bax, appelé Bax Ψ , dans des glioblastomes de bas grade, qui est constitutivement mitochondrial et actif [151]. Ce variant de Bax contribue à ralentir la progression tumorale de façon plus efficace que Bax^{WT}. Le fait le plus intéressant concernant Bax Ψ est qu'il est issu d'un épissage alternatif qui fait que la traduction démarre à la Méthionine 20 au lieu de la Méthionine initiatrice 1. Bax Ψ ne contient donc pas les résidus 1-19 tout comme le mutant Bax Δ ART généré par Goping et al (1998) [150].

Dans notre système *in vitro*, les nanodisques induisent un changement conformationnel de Bax impliquant un mouvement du domaine ART, car l'épitope de l'anticorps conformationnel 6A7 est localisé dans ce domaine. Pour confirmer le rôle de l'ART dans ce processus, nous avons comparé les phénotypes de Bax^{WT} et Bax Ψ dans notre système de synthèse en «Cell-free» en présence ou en absence de nanodisques.

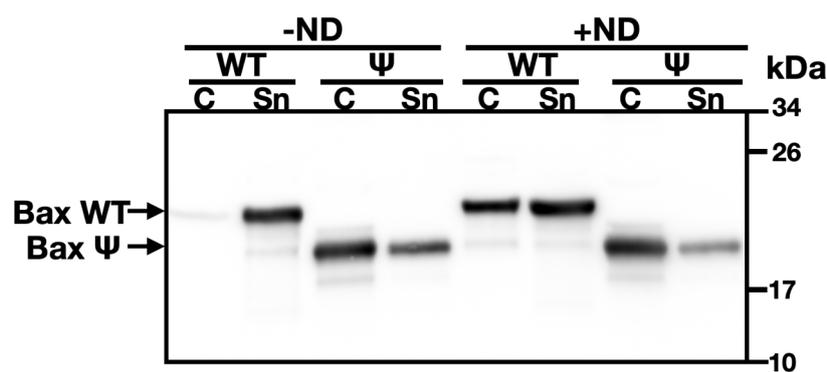
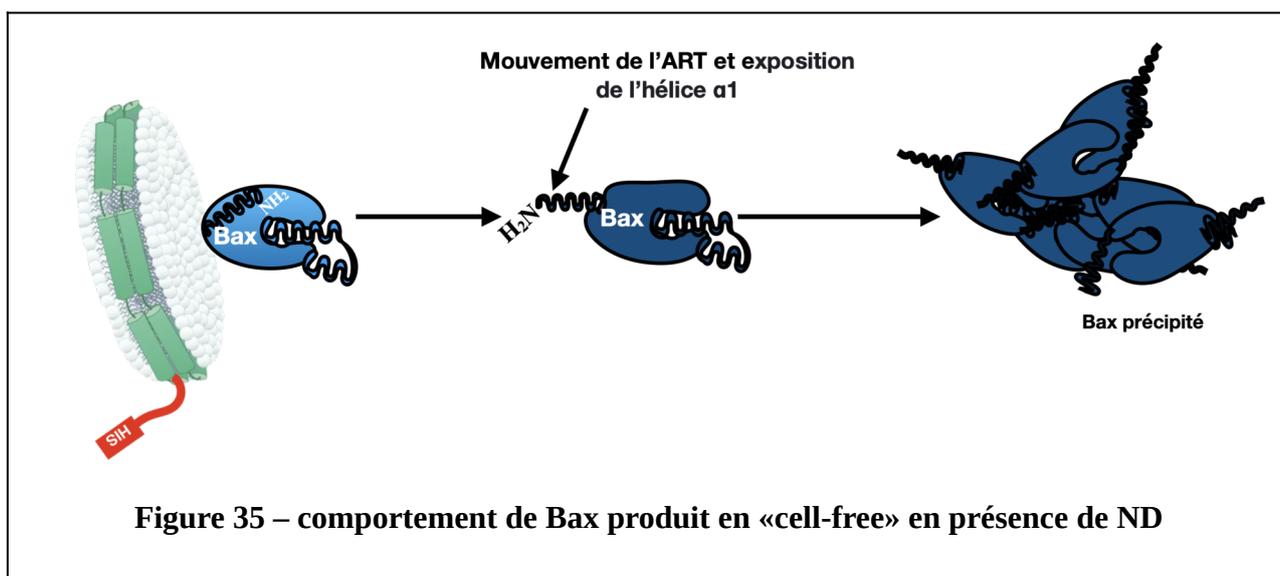


Figure 34 – Bax Ψ est précipitée en absence et en présence de nanodisques

Bax^{WT} et Bax Ψ ont été produites en «Cell-free» en présence ou en absence de nanodisques (ND). Les milieux réactionnels ont été centrifugés (20000 x g pendant 15 min). Les culot (C) et les surnageants (Sn) ont été analysés par western blot.

Contrairement à Bax WT qui est soluble en absence de nanodisques et ne précipite qu'en leur présence, Bax Ψ est précipitée, que les nanodisques soient présents ou pas (**fig 34**). Le changement conformationnel induit par la bicouche lipidique sur Bax WT est donc constitutivement présent dans Bax Ψ . Cette observation permet (i) de confirmer le rôle régulateur de l'ART dans la précipitation de Bax WT lorsque ce dernier est produit en «cell-free» en présence de nanodisques, et (ii) de confirmer l'hypothèse que la précipitation de Bax est liée à ce changement conformationnel impliquant l'ART. De plus, le fait que Bax précipite sans son ART suggère que l'ART n'est pas directement impliqué dans cette précipitation.



Grâce à ces données, nous avons pu mettre en évidence que la précipitation de Bax qui survient lorsque ce dernier est produit en système «cell-free» en présence de nanodisques n'est pas un biais de production entraînant une mauvaise conformation de la protéine néo-synthétisée conduisant à sa précipitation. *A contrario*, il s'agit d'un comportement inhérent à la protéine, non soupçonné jusqu'ici, lié à son interaction avec la bicouche lipidique.

Pour expliquer ce comportement, notre hypothèse est que lorsque Bax est produite en «cell-free» en présence de nanodisques, elle interagit avec la bicouche lipidique, ce qui entraîne un mouvement de l'ART. La conséquence de ce mouvement est l'exposition de certains domaines hydrophobes cachés de la protéine. Ces domaines ainsi exposés vont se stabiliser en interagissant entre eux entraînant ainsi la précipitation de la protéine (**fig 35**).

L'ART joue un rôle très important dans la régulation de la translocation de Bax vers la mitochondrie *in cellulo* et *in vivo* [150], [156]. Nous venons de voir que ce même domaine est impliqué dans la précipitation de Bax dans notre système *in vitro*. Notre modèle permet donc non seulement l'étude

de la translocation de Bax dans les nanodisques, mais aussi la caractérisation des conditions favorisant les changements conformationnels à l'extrémité N-terminale de la protéine.

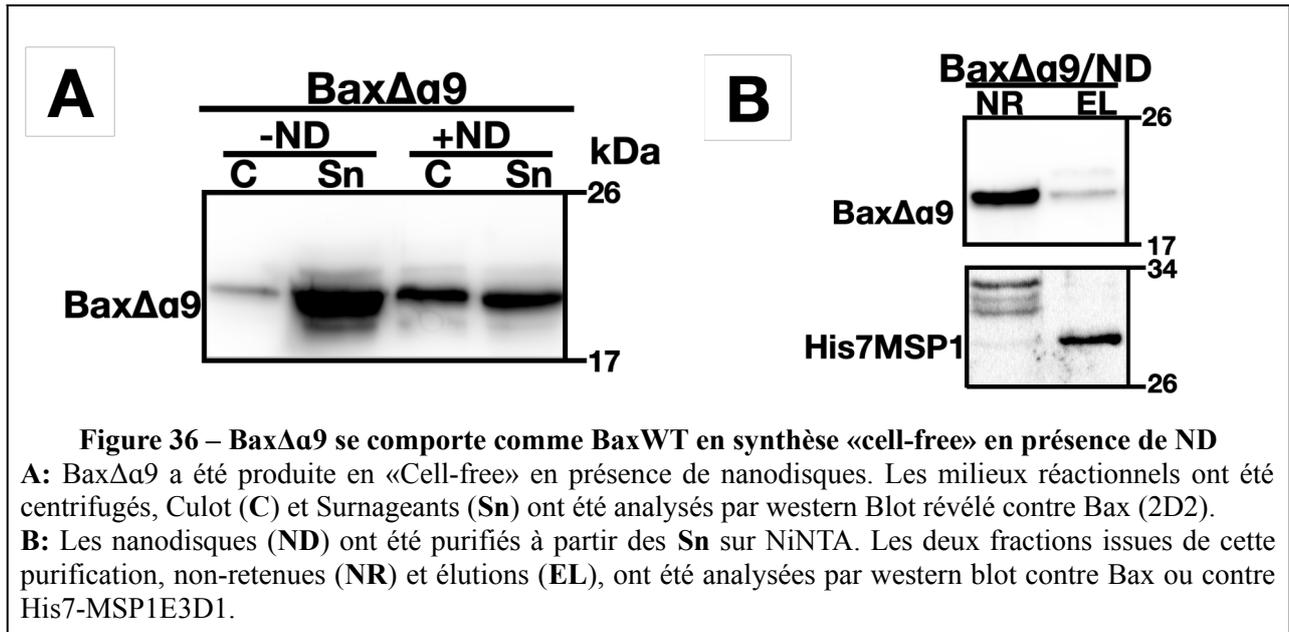
Pour aller plus loin dans la compréhension de la précipitation de Bax induite par les nanodisques, nous avons exploré les domaines de Bax pouvant être impliqués dans ce processus.

6. Le domaine «GALLL» de l'hélice α 1 est directement impliqué dans la précipitation de Bax induite par la bicouche lipidique

La perméabilisation de la MOM aux facteurs apoptogènes requiert l'insertion et l'oligomérisation de Bax dans cette dernière. Dans notre système *in vitro*, Bax subit un changement conformationnel dû à la présence de la bicouche. Certaines zones hydrophobes de la protéine sont *a priori* exposées, mais la protéine n'est pas insérée. Pour identifier les zones de Bax exposées suite au mouvement de l'ART, nous avons généré des mutants de Bax dans lesquels l'exposition des domaines hydrophobes connus est modifiée.

Il existe deux grandes régions hydrophobes dans Bax, l'hélice α 9, et le sillon hydrophobe formé par les domaines BH. Dans la conformation soluble de Bax, l'hélice α 9 est stabilisée dans le sillon hydrophobe. La mutation de la P168 en Alanine en amont de l'hélice α 9 confère à cette dernière une mobilité accrue, comparée à la protéine sauvage. Ainsi, les deux régions hydrophobes de la protéine sont probablement plus exposées dans le mutant que dans la protéine sauvage. On pouvait donc s'attendre à ce que ce mutant précipite spontanément. Cependant, nous avons vu précédemment que le mutant P168A est soluble en absence de nanodisques et ne précipite qu'en leur présence (**fig 29A**), suggérant que ni l'exposition de la poche hydrophobe, ni celle de l'hélice α 9 ne sont impliquées dans la précipitation de Bax induite par les nanodisques.

Une explication possible est que l'exposition des hélices α 9 de différentes molécules de Bax P168A entraîne leur dimérisation en raison de leur caractère hydrophobe. Nous avons donc généré un mutant Bax $\Delta\alpha$ 9 et analysé son comportement dans notre système *in vitro*.



Tout comme Bax WT, BaxΔα9 est soluble en absence de nanodisques ce qui suggère que l'exposition du sillon hydrophobe n'est pas responsable de la précipitation de Bax (**fig 36A, partie «-ND»**). D'autre part, BaxΔα9 précipite toujours en présence de nanodisques, ce qui suggère que l'hélice α9 n'est pas non plus impliquée dans la précipitation de Bax induite par les nanodisques (**fig 36A, partie «+ND»**). De plus, la délétion de l'hélice α9 ne permet pas de co-purifier Bax avec les nanodisques (**fig 36B**), ce qui montre que l'exposition du sillon hydrophobe n'est pas suffisante pour permettre l'insertion de Bax dans des nanodisques.

Prises ensemble, les observations sur les mutants Bax P168A et BaxΔα9 semblent montrer que ni l'hélice α9 ni le sillon hydrophobe ne sont impliqués dans la précipitation de Bax induite par les nanodisques. Ces données indiquent que le changement conformationnel et la précipitation induits par la bicouche lipidique n'impliquent que l'extrémité N-terminale de la protéine.

Nous avons vu précédemment que BaxΨ (dans lequel l'ART est absent) présente de façon constitutive le changement conformationnel qui entraîne la précipitation de Bax WT induite par les nanodisques. D'après les travaux de Cartron et al, la suppression de l'ART permet d'exposer l'hélice α1 de Bax [142]. L'hélice α1 pourrait donc être le domaine de Bax responsable de sa précipitation induite par la bicouche lipidique.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons généré un mutant de Bax dans cette hélice. Un résidu aliphatique, en l'occurrence l'alanine 24 (A24) (**fig 37A**), a été muté en arginine (R24). L'introduction d'un résidu chargé positivement permet d'empêcher d'éventuelles interactions entre deux hélices α1.

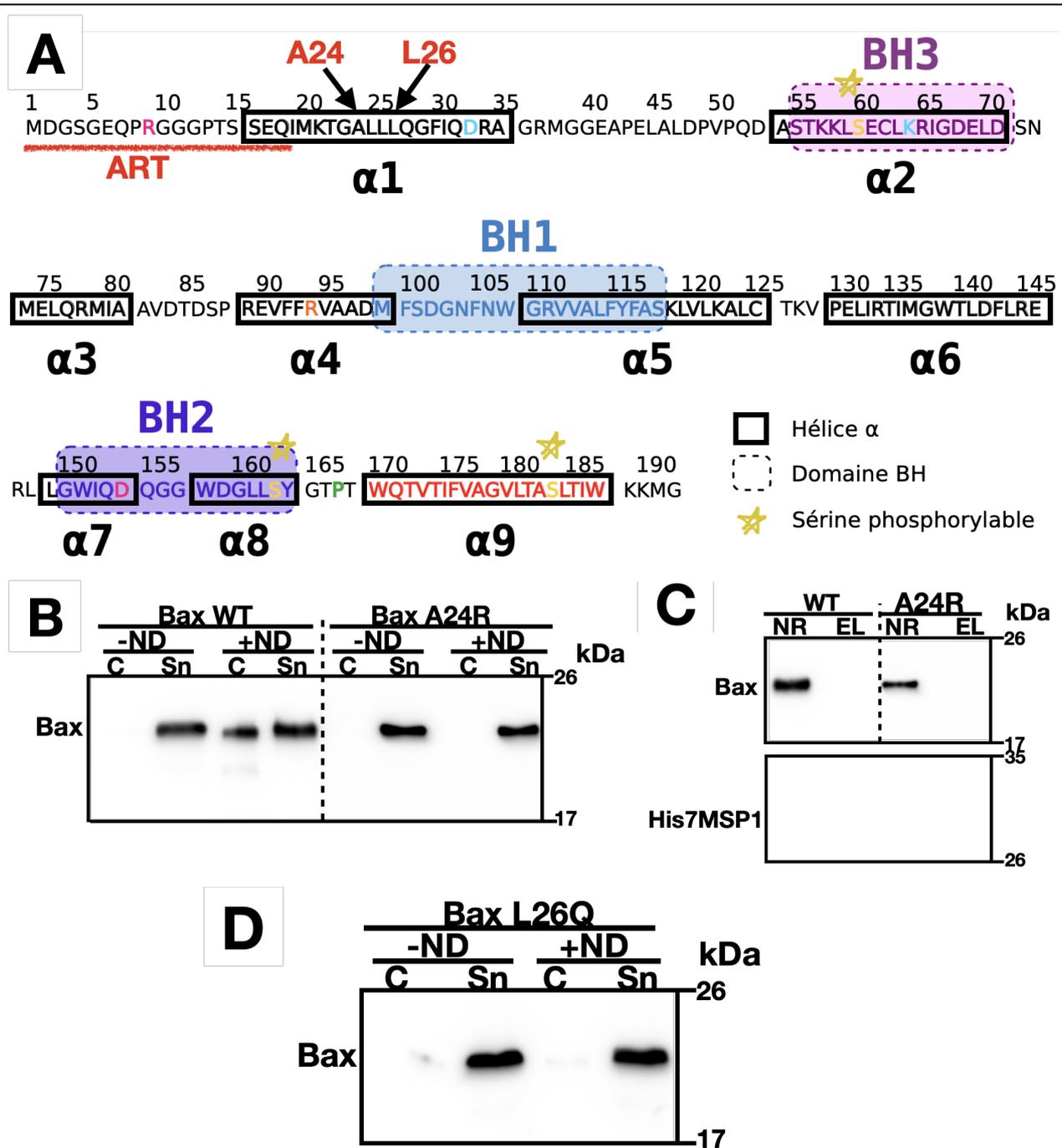


Figure 37 – implication de l'hélice α1 dans la précipitation de Bax suite au changement conformationnel induit par les ND

A: structure primaire de Bax [290].

B : Bax A24R a été produite en «Cell-free» en présence de nanodisques. Les milieux réactionnels ont été centrifugés, Culot (C) et Surnageants (Sn) ont été analysés par western Blot révélé contre Bax (2D2).

C : Les nanodisques (ND) ont été purifiés à partir des Sn sur NiNTA. Les deux fractions issues de cette purification, non-retenues (NR) et elutions (EL), ont été analysées par western blot soit contre Bax ou contre His7-MSP1E3D1.

D : Bax L26Q a été produite en «Cell-free» en présence de nanodisques. Les milieux réactionnels ont été centrifugés, Culot (C) et Surnageants (Sn) ont été analysés par western Blot révélé contre Bax (2D2).

Contrairement à Bax WT, Bax A24R ne précipite pas en présence de nanodisques (**fig 37B**). De plus, tout comme Bax WT, le mutant A24R n'est pas co-purifié avec les nanodisques (**fig 37C**). La substitution d'un résidu hydrophobe (A24) dans l'hélice $\alpha 1$ par un résidu hydrophile et chargé (R) est donc suffisante pour empêcher la précipitation de Bax survenant après le changement conformationnel induit par les nanodisques. L'arginine (R) étant hydrophile et chargée, elle permettrait non seulement d'éviter l'interaction des hélices $\alpha 1$ entre elles (par répulsion de charges), mais aussi de rendre cette hélice plus soluble.

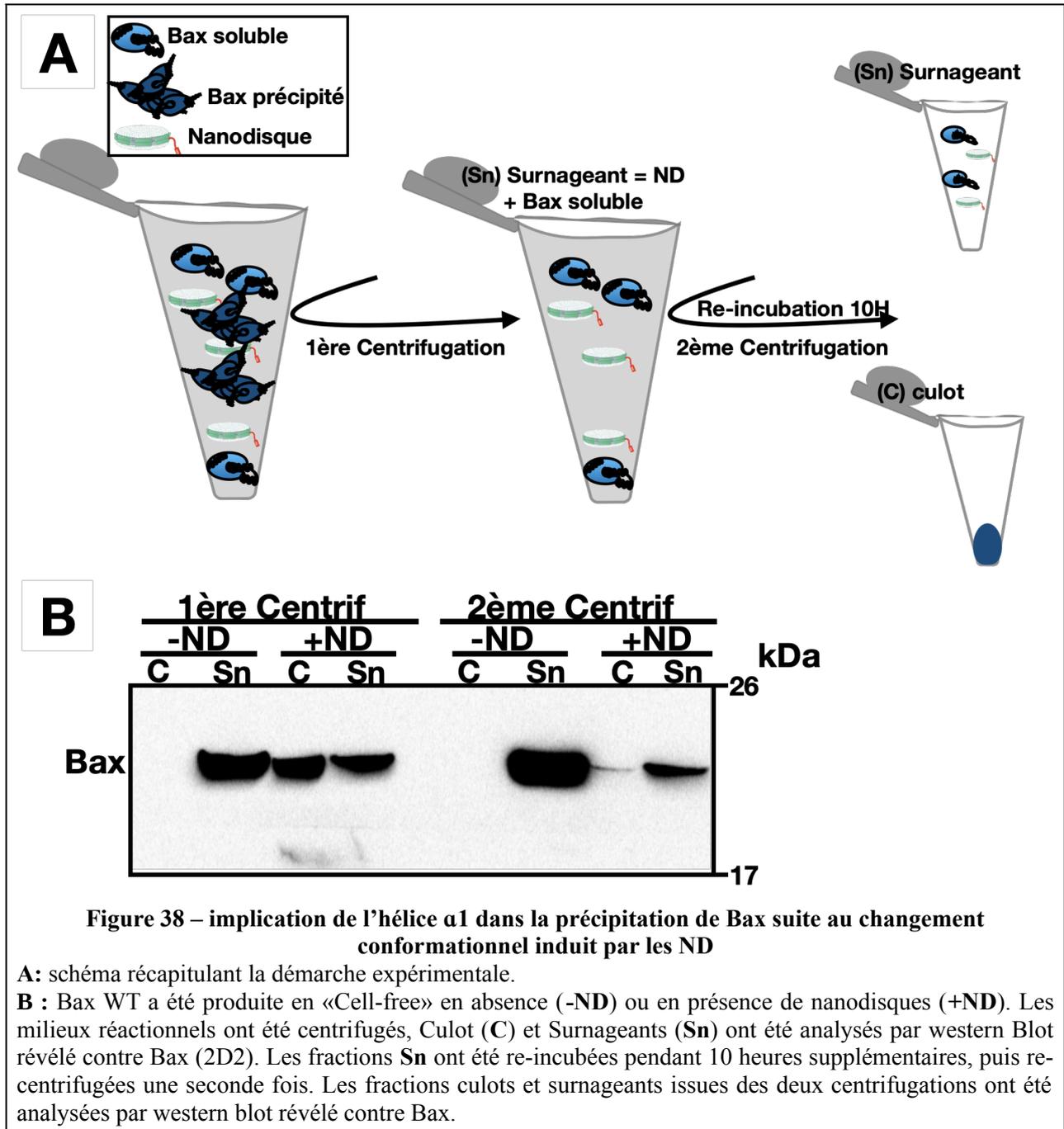
Dans sa globalité, l'hélice $\alpha 1$ est plutôt amphiphile; cependant, sa région centrale est constituée de 5 résidus hydrophobes (GALLL) dont l'alanine 24 (**fig 37A**). Nous avons testé la mutation d'un autre résidu dans cette région hydrophobe de l'hélice, soit la leucine 26 (L26). Cette dernière a été substituée par un résidu hydrophile non chargé, la glutamine (Q). Comme Bax A24R, le mutant L26Q ne précipite pas en présence de nanodisques (**fig 37D**). Ceci confirme que la zone hydrophobe «GALLL» de l'hélice $\alpha 1$ est responsable de la précipitation de Bax qui survient suite au changement conformationnel induit par les nanodisques. On peut donc supposer que ce domaine de l'hélice $\alpha 1$ était donc masqué par l'ART dans la forme soluble de la protéine.

7. Mise en évidence d'un second changement conformationnel de Bax induit par les nanodisques

Comme nous venons de le décrire, Bax synthétisée en "cell-free" interagit avec les nanodisques. Cette interaction implique un mouvement de l'ART de Bax, ce qui entraîne l'exposition du domaine «GALLL» de l'hélice $\alpha 1$. L'exposition de ce domaine hydrophobe de l'hélice $\alpha 1$ entraîne la précipitation de la protéine.

Cependant, il convient de noter qu'une fraction importante de Bax reste soluble dans le surnageant malgré la présence de nanodisques. Nous nous sommes demandé pourquoi cette fraction de Bax ne précipite pas.

L'hypothèse la plus triviale était que cette fraction de Bax ne pouvait interagir avec les nanodisques en raison de l'encombrement stérique causé par les précipités de Bax.



Nous avons éliminé cette hypothèse en laissant cette fraction de Bax en contact avec les nanodisques pendant 10 heures supplémentaires après avoir éliminé les précipités de Bax (**fig 38A**). Nous avons observé que même après cette longue incubation en présence de nanodisques, cette fraction de Bax ne précipite que très faiblement (**fig 38B**). Cette observation suggère que cette fraction de Bax représente une population distincte possédant une conformation qui limite l'interaction avec les nanodisques.

Pour tester cette hypothèse, Il nous faut mettre en évidence que cette population de Bax qui reste soluble malgré la présence de nanodisques, possède une conformation différente de celle de Bax qui n'a pas été en contact avec les nanodisques.

Dengler et al ont décrit un méthode permettant d'évaluer l'accessibilité ou l'insertion de l'hélice 9 dans un environnement membranaire [225]. Le principe consiste à marquer les cystéines non enfouies dans la bicouche lipidique par le N-éthylmaléimide-Polyéthylène glycol (NEM-PEG 5kDa). Le N-éthylmaléimide est un alcène qui réagit avec les thiols et le polyéthylène glycol qui y est greffé augmente relativement la taille de la protéine marquée qui va donc migrer différemment en SDS-PAGE de la protéine non marquée. Bax possède deux cystéines endogènes, la cystéine 62 (C62) dans l'hélice 2 (domaine BH3) et la cystéine 126 (C126) à la fin de l'hélice 5. Nous avons muté individuellement chacune des cystéines en sérine, puis évalué leur marquage après la synthèse de Bax en "cell-free" en présence ou en absence de nanodisques. Ainsi, lorsque la cystéine C62 est mutée en sérine (C62S), c'est le marquage de la cystéine 126 qui est évalué et vice-versa.

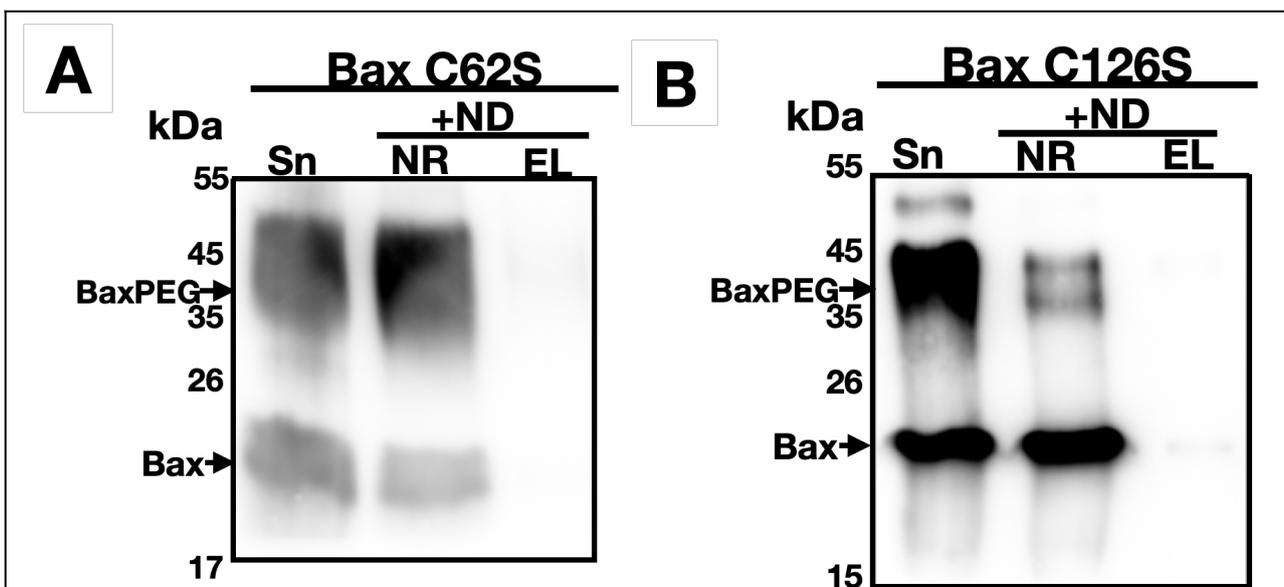


Figure 39 – différents changements conformationnels induits par les nanodisques sur Bax

A et B : Bax C62S et C126S ont été produites en «Cell-free» en présence de nanodisques. Les milieux réactionnels ont été centrifugés, les culots (C) ont été éliminés et les nanodisques (ND) dans les fractions surnageants (Sn) ont été purifiés sur résine NiNTA. Les deux fractions issues de cette purification, non-retenues (NR) et elutions (EL), ainsi que les fractions surnageants (Sn) de conditions de productions en absence de ND ont été incubées avec 0,2mM de NEM-PEG pendant 1minute. La réaction a été arrêtée avec du N-éthyle Maléimide (NEM). Les fractions ont été analysées par western blot révéler contre Bax.

Lorsqu'ils n'ont pas été en contact avec les nanodisques (**fig 39 A et B puits "Sn"**), les mutants Bax C62S et Bax C126S sont marqués par le NEM-PEG. Ceci suggère que la conformation de Bax en solution permet le marquage de ces cystéines. Lorsque ces mutants de Bax sont synthétisés en présence de nanodisques, la population qui reste soluble malgré la présence de nanodisques n'est

pas co-purifiée avec ces derniers (**fig 39 A et B puits "NR"**), ce qui est cohérent avec le comportement que nous avons précédemment décrit pour Bax WT, montrant que les mutations C62S et C126S ne changent pas le comportement de Bax.

Cette population est marquée par le NEM-PEG pour Bax C62S, mais pas pour Bax C126S. Bax possédant deux cystéines (C62 et C126), la mutation de la cystéine C62 en sérine rend cette cystéine non éligible au marquage, c'est donc le marquage de la cystéine C126 qui est évalué. Cette dernière reste marquée même pour la population de Bax qui reste soluble malgré la présence des nanodisques, ce qui suggère que cette population de Bax ne subit pas de changements conformationnels dans la zone où se situe cette cystéine (à la fin de l'hélice $\alpha 5$, proche de la boucle $\alpha 5$ - $\alpha 6$).

Par contre, la situation est différente pour le mutant Bax C126S, dont la seule cystéine éligible au marquage est la cystéine C62 localisée dans l'hélice $\alpha 2$ (domaine BH3). La population de Bax qui reste soluble malgré la présence des nanodisques perd la capacité à être marquée par le NEM-PEG. Ceci traduit un changement de conformation dans l'hélice $\alpha 2$ suite à l'interaction avec les nanodisques. Ce changement de conformation n'entraîne pas la précipitation de Bax; il est donc distinct de celui qui entraîne la précipitation de Bax en impliquant l'exposition du domaine «GALLL». Ce second changement semble lié à un réarrangement du domaine BH3 (l'hélice $\alpha 2$) de la protéine.

8. Discussion du chapitre I

La bicouche lipidique (ici les nanodisques) entraîne donc un changement conformationnel de Bax au niveau N-terminal, et la précipitation de Bax qui s'ensuit implique uniquement un domaine localisé dans cette extrémité de la protéine. En effet, Bax $\Delta\alpha 9$ dépourvue de son hélice hydrophobe transmembranaire C-terminale et dont la poche hydrophobe est *a priori* exposée, se comporte comme Bax sauvage (**fig 36**).

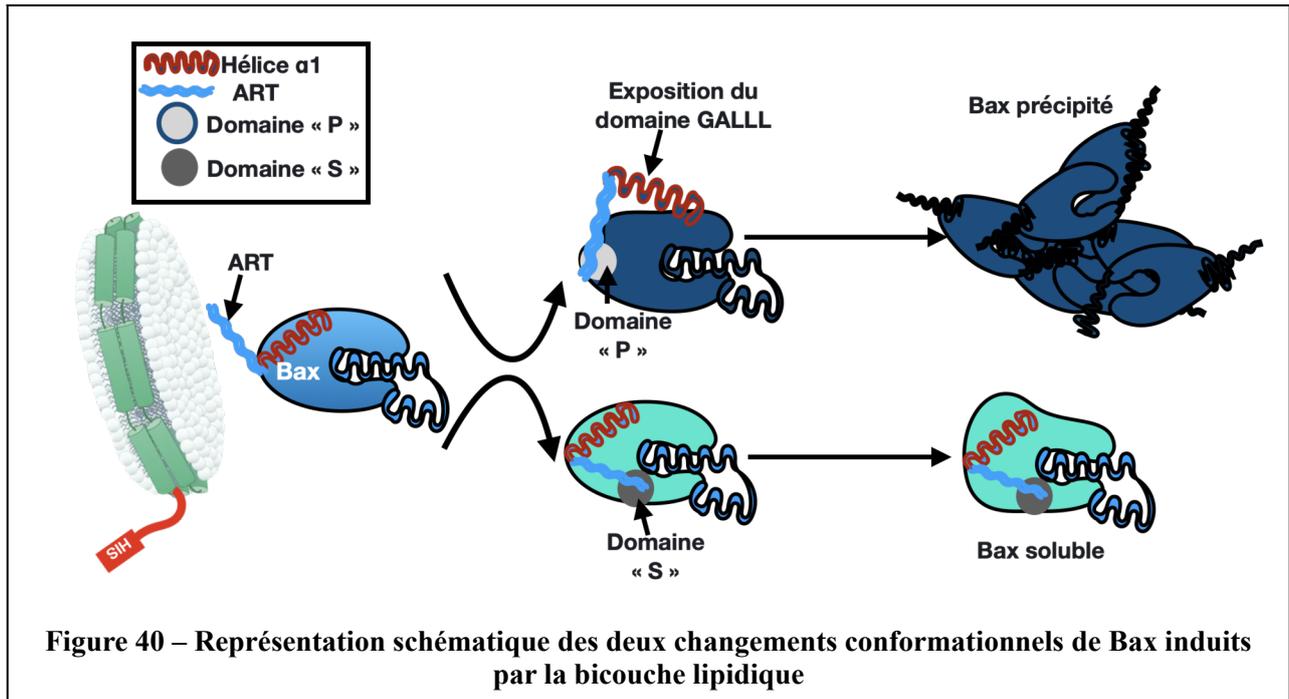
Le seul mutant qui précipite en absence de nanodisques est Bax Ψ , dont l'hélice $\alpha 1$ est exposée suite à la délétion de l'ART. Nous avons donc supposé que l'hélice $\alpha 1$ contenait le domaine responsable de la précipitation. Bien qu'étant globalement amphiphile, l'hélice $\alpha 1$ contient une zone hydrophobe assez longue (GALLL) pour former un tour d'hélice complet (3,6 résidus). La réduction du caractère hydrophobe de cette zone par la mutation de l'alanine 24 en arginine (A24R) ou celle de la leucine 26 en glutamine (L26Q) ont permis de prévenir la précipitation de Bax qui fait suite au changement conformationnel induit par la bicouche lipidique.

En outre, nous avons observé que la production de Bax en présence de nanodisques générerait deux populations distinctes:

- (i) La population de Bax précipitée décrite précédemment, dont le mouvement de l'ART expose le domaine «GALLL» de l'hélice $\alpha 1$;
- (ii) une population de Bax qui reste soluble. Cette population n'étant pas associée aux nanodisques (**fig 29B et 36B**), sa présence dans le surnageant n'est pas liée à l'insertion dans la bicouche lipidique. Les expériences de mesure d'accessibilité du résidu cystéine en position 62 dans l'hélice $\alpha 2$ (domaine BH3) ont montré que cette population de Bax subit un changement conformationnel distinct du précédent, qui modifie l'exposition du domaine BH3 (hélice $\alpha 2$). Ce changement semble limiter l'interaction de Bax avec la bicouche lipidique.

Comment expliquer que l'interaction de Bax avec la bicouche lipidique aboutisse à deux changements conformationnels distincts de la protéine? La réponse se trouve peut-être dans les propriétés physico-chimique de l'ART.

En effet, l'ART de Bax apparaît non structurée en RMN [118], et est donc un domaine très mobile en solution. Il est possible qu'à l'issue de l'interaction avec la bicouche lipidique, cette mobilité de l'ART soit réduite. Ainsi, l'ART pourrait se stabiliser dans une conformation grâce à l'établissement d'interactions avec un ou des résidus non encore identifiés. De façon intéressante, Arokium et al, ont proposé l'existence de deux conformations stables sur la base de la formation de liaisons ioniques entre l'ART et l'hélice $\alpha 7$ [157]. Si plusieurs conformations stables de l'ART existent, cela pourrait générer plusieurs conformations de Bax. Il serait alors possible d'identifier différents domaines de Bax capable d'interagir avec l'ART pour générer les deux conformations induites par la bicouche lipidique (**fig 40**).



Nous pouvons postuler l'existence de deux domaines potentiels de stabilisation de l'ART :

- Un « domaine P », dont l'interaction avec l'ART conduit à l'exposition du domaine «GALLL» et donc à la précipitation de Bax.

- Un « domaine S» dont l'interaction avec l'ART modifie l'exposition du domaine BH3 sans exposer le domaine «GALLL» de l'hélice $\alpha 1$; dans ce cas Bax demeure soluble. Dans cette conformation, l'interaction de Bax avec la bicouche lipidique est très limitée comme l'a montré l'absence d'association avec les nanodisques même lorsque l'incubation en présence de nanodisques est prolongée pendant plusieurs jours (**fig 41**) .

Ainsi, la bicouche lipidique semble induire non pas un, mais deux changements conformationnels distincts de la protéine Bax, tous deux contribuant à maintenir la protéine éloignée de la bicouche et inhibant ainsi son insertion.

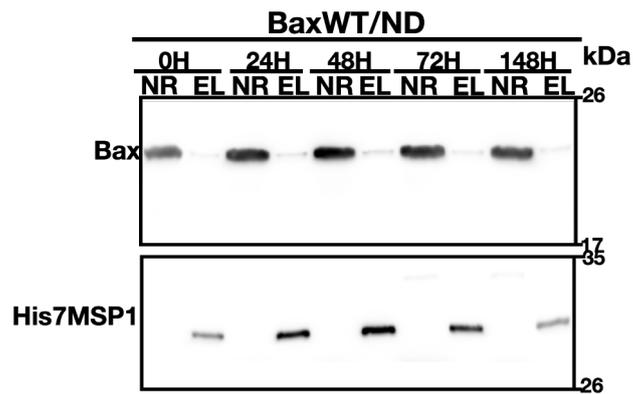


Figure 41 – La population soluble de Bax ne s’insère pas même après une incubation prolongée
 Bax WT a été produites en «Cell-free» en présence de nanodisques (ND). Les milieux réactionnels ont été centrifugés (20000 x g pendant 15 min) pour éliminer la fraction précipitée. La fraction soluble a été incubée avec la résine NiNTA et la purification des nanodisques a été réalisée après les temps indiqués.

Comment extrapoler nos observations dans un contexte cellulaire où les bicouches lipidiques sont abondantes?

Yethon et al [174] se sont posés la même question lorsqu’ils ont montré que les liposomes entraînaient une exposition transitoire de l’épitope de l’anticorps conformationnel 6A7 (zone exposée seulement quand la protéine est active) [173] situé dans l’ART de Bax. Cette expérience a été refaite avec des mitochondries isolées ainsi qu’avec des vésicules de réticulum endoplasmique (RE) isolées. De façon inattendue, ces membranes biologique ont été incapables d’induire l’exposition de l’épitope 6A7 de Bax, contrairement aux liposomes (Yethon et al., 2003) [174].

La différence entre les liposomes et les membranes biologiques est que ces dernières sont riches en protéines. L’hypothèse proposée par Yethon et al est que l’effet des bicouches lipidiques sur Bax ne pourrait s’observer sur des membranes biologiques que si ces dernières étaient hypothétiquement dépourvues de protéines, comme cela pourrait être le cas pour les zones de dommages ou de remodelage des membranes. Ces zones de dommages ou de remodelage des membranes biologiques pourraient faciliter l’insertion de Bax en amorçant son activation *via* le changement conformationnel induit par la bicouche lipidique. Ils se sont notamment appuyés sur les travaux de Karbowski et al qui ont montré que l’oligomérisation de Bax n’a lieu que dans des foyers apoptotiques discrets de la MOM correspondant à des zones où a lieu la fission mitochondriale [83]. Ces zones de fission mitochondriale sont des zones de remodelages de la mitochondrie où l’organisation des membranes mitochondriales peut être différente de l’organisation normale [226]. Cette interprétation n’est cependant pas cohérente avec le comportement de Bax que nous observons. En effet, dans notre travail, le changement conformationnel induit par la bicouche

lipidique entraîne la précipitation de Bax et ce, peu importe le variant de la protéine (BaxWT, Bax Ψ , ou mutant constitutivement membranaire et actif P168A) (**figure 29A et 34**). De plus, même la fraction de Bax qui reste dans le surnageant n'est pas insérée dans les nanodisques. Une hypothèse plausible pourrait être que la présence des activateurs directs de Bax soit requise pour son insertion dans les nanodisques.

Même si les actions des protéines à BH3 seulement (activateurs directs de Bax) sont bien décrites dans la littérature [227] [124] [134] [126] [181] [228], la nature de leur mode d'action sur les membres pro-apoptotiques (Bax et Bak) de la famille de Bcl-2 reste débattue.

En effet, Peng et al (2013) ont montré que la rupture, par mutagenèse, de l'interaction entre Bax et ses activateurs directs tel que tBid, Bim et PUMA, n'empêchait pas Bax de subir le changement conformationnel nécessaire à son insertion dans la MOM, et de déclencher l'apoptose dans les cellules HCT116 [229].

Willis et al (2007) [185] et Huang et al (2019) [186] ont montré que la différence d'affinité des protéines à BH3 seulement pour les protéines pro- ou anti-apoptotiques fait que leur action passerait essentiellement par l'inhibition des protéines anti-apoptotiques.

Ruffolo et al (2000) ont montré que, dans des fibroblastes de souris KO pour Bid, Bax est capable de s'insérer dans la MOM en réponse à l'induction de l'apoptose, mais n'induit la libération du cytochrome c que lorsque Bid est re-exprimé [230]. Leur hypothèse est qu'il existe une autre voie d'insertion de Bax indépendante de Bid et que ce dernier serait plutôt nécessaire à l'oligomérisation de Bax.

Les données que nous avons obtenues dans notre système *in vitro* avec les nanodisques comme objets mimant l'environnement membranaire montrent que l'insertion de Bax n'est pas un processus spontané, mais nécessite probablement la présence de partenaires. Les partenaires les plus évidents étaient les activateurs directs de Bax (Bid, Bim et PUMA). Cependant nous avons observé que Bid-BH3, Bim-BH3 et BTSA1 sont incapables de stimuler l'association de Bax avec les nanodisques (Fig 3B). Nous avons également testé la protéine cBid (Bid clivé par la caspase 8), qui n'est pas non plus efficace pour stimuler l'association de Bax avec les nanodisques. Par conséquent, les protéines à domaine BH3 seulement activatrices ne sont pas les partenaires permettant l'insertion de Bax dans les nanodisques.

Ceci peut sembler contradictoire avec les données de la littérature sur les liposomes. Par exemple, Kuwana et al., 2002 ont montré que Bax activée par cBid ou Bid-BH3 induit la perméabilisation des liposomes à des dextrans de 10kDa et 2000kDa [231]. Cependant, Roucou et al ont montré que tBid

stimule l'insertion de Bax dans des liposomes mais n'induit pas une oligomérisation suffisante pour former des pores de grandes tailles [232].

Comment expliquer que les activateurs directs stimulent l'insertion de Bax dans les liposomes mais pas dans les nanodisques?

Il existe une différence manifeste entre les liposomes et les nanodisques concernant l'empilement et la fluidité de la bicouche. En effet Real Hernandez et Levental ont montré que les têtes polaires des lipides ont un empilement plus serré dans les nanodisques que dans les liposomes. Bien que ni l'un ni l'autre ne conserve à l'identique les propriétés physiques d'une membrane biologique (dont la composition en protéines est estimée à environ 50%), la contrainte physique exercée par la protéine d'échafaudage des nanodisques rend l'empilement des lipides plus proche de celui des membranes biologiques, comparé aux liposomes [233]. Ceci peut expliquer la différence de comportement de Bax observée lorsqu'elle est en présence de nanodisques ou de liposomes. On pourrait envisager que la compacité des lipides dans les nanodisques soit peu favorable à l'insertion spontanée de Bax.

Toutes ces observations concourent à soutenir notre hypothèse selon laquelle le changement conformationnel entraînant la translocation et l'insertion de Bax dans la MOM est un processus multi-étapes, et chaque étape nécessite l'intervention d'un partenaire distinct. En effet, la plupart de ces études sont réalisées *in cellulo* ou sur des mitochondries isolées. Contrairement à notre système *in vitro* qui est minimaliste, la complexité de ces systèmes peut donc conduire à sous-estimer la contribution d'autres partenaires mitochondriaux dans le changement conformationnel aboutissant à l'insertion de Bax dans la MOM. D'ailleurs, Schafer et al ont montré que l'action de tBid sur l'activation de Bax nécessite la présence de composants de la MOM pour être optimale [234].

On pourrait donc envisager que la précipitation de Bax mise en évidence dans notre système *in vitro* relève d'un changement conformationnel inachevé de la protéine du fait d'un partenaire manquant. Ce comportement de la protéine constitue donc un outil de choix pour réaliser un criblage des partenaires potentiels. Dans le second chapitre de ce manuscrit, nous allons donc explorer les partenaires connus de Bax afin d'identifier ceux qui peuvent favoriser son insertion dans les nanodisques.

II. TOM22, partenaire indispensable pour l'insertion de Bax dans les nanodisques

1. Contexte

Outre les domaines d'homologies BH qu'elles partagent entre elles, les protéines de la famille de Bcl-2 partagent également une homologie structurale. Kaufmann et al ont montré que leur hélice C-terminale était suffisante pour cibler et insérer les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et, partiellement, Bcl-2 dans la MOM [103]. En conditions non apoptotiques, dans la plupart des lignées cellulaires, Bax est majoritairement cytosolique et soluble. Pour perméabiliser la MOM aux facteurs apoptogènes, Bax doit nécessairement subir des changements conformationnels permettant son insertion et son oligomérisation dans la MOM. Les mécanismes qui sous-tendent ce changement de conformation sont encore mal connus. En effet, les protéines de la famille de Bcl-2, pro- ou anti-apoptotiques, exhibent des ressemblances structurales très marquées. Un exemple est la présence d'une hélice α C-terminale hydrophobe pouvant potentiellement servir d'ancre membranaire. Cependant, s'il est vrai que cette hélice est nécessaire et suffisante pour cibler et insérer les protéines anti-apoptotiques, Bcl-xL et, partiellement, Bcl-2 dans la MOM [103], la situation est complètement différente en ce qui concerne Bax. Le positionnement de l'hélice C-terminale dans le sillon hydrophobe est important dans le maintien de la forme cytosolique de la protéine [218] (pour revue). De plus, contrairement à l'hélice C-terminale de Bcl-2 et de Bcl-xL, celle de Bax ne peut être considérée comme une séquence d'adressage à la MOM. En effet, en utilisant des protéines chimère entre Bax et Bcl-xL, Suzuki et al (2000) [118] et Tremblais et al (1999) [235] ont montré que l'hélice C-terminale de Bax ne permet pas l'adressage de Bcl-xL à la MOM alors que celle de Bcl-xL permet l'adressage de Bax. Cette différence est en partie liée à la présence d'un domaine chargé positivement en amont de l'hélice C-terminale de Bcl-xL et Bcl-2 baptisé «X domain» [103].

Cependant, une fois que l'apoptose est déclenchée, Bax cible spécifiquement la MOM. Ceci suggère que la protéine possède un mécanisme d'adressage à la MOM distinct de celui de Bcl-xL et Bcl-2. Cartron et al ont suggéré que l'hélice $\alpha 1$ de Bax présente des ressemblances avec une séquence d'adressage à la mitochondrie [142]. En effet la suppression de cette hélice suffit à empêcher l'adressage de Bax Ψ (un variant de Bax constitutivement mitochondrial *in cellulo*) vers la mitochondrie. De plus, des mutations ponctuelles de l'alanine 24 (A24) ou de la leucine 26 (L26) dans l'hélice $\alpha 1$ sont également suffisantes pour empêcher l'adressage de Bax^{WT} et Bax Ψ vers la

MOM. De façon intéressante, ces résidus sont localisés dans le motif «GALLL». Enfin, une protéine chimérique contenant l'hélice $\alpha 1$ de Bax fusionnée à la RFP était adressée à la mitochondrie, et inhibait l'interaction de Bax Ψ avec la mitochondrie. Ceci suggérait l'implication possible d'un récepteur mitochondrial pour le signal d'adressage porté par l'hélice $\alpha 1$ de Bax. Bellot et al (2007) ont identifié la sous-unité TOM22 du complexe TOM comme étant un récepteur mitochondrial de Bax [143]. Une approche de peptide mapping a permis de déterminer que l'hélice $\alpha 1$ et la boucle entre les hélices $\alpha 5$ - $\alpha 6$ étaient les domaines de Bax possiblement impliqués dans l'interaction avec TOM22. De plus, la saturation de TOM22 par son anticorps, ou un "knock-down" de son expression, étaient suffisants pour empêcher l'association de Bax avec des mitochondries. En conséquence, l'apoptose liée à Bax est inhibée. Ces observations mettent en lumière un rôle insoupçonné de TOM22 dans le recrutement de Bax dans la MOM.

Il a été ultérieurement proposé que le complexe TOM dont fait partie TOM22 était impliqué dans l'intégration membranaire de Bax dans une conformation apte au relargage des facteurs apoptogènes [176].

Cependant, les mécanismes qui sous-tendent le recrutement de Bax par TOM22 dans la MOM restent discutés. Sanjuán Szklarz et al, (2007) n'ont observé aucun effet des sous-unités de TOM sur les effets de Bax dans la levure [146], alors que Ott et al (2007) ont observé le contraire [145]. Ross et al (2009) n'ont trouvé aucune dépendance de la localisation mitochondriale de Bax vis-à-vis des systèmes d'import dans des cellules HeLa [147], alors que Colin et al (2009) ont rapporté une dépendance des effets de Bax vis-à-vis de Tom22 et Tom70 dans la drosophile [144].

L'avantage majeur de notre approche *in vitro* réside dans le fait que nous démarrons avec un système minimaliste ne contenant que notre protéine d'intérêt et un environnement membranaire. Contrairement au modèle cellulaire qui est complexe en raison d'un réseau intriqué d'interaction de Bax avec ses partenaires potentiels, notre système peut être progressivement complexifié. Ceci permet de mieux apprécier l'effet et la nécessité des partenaires de Bax pour son insertion dans ses différentes conformations. Grâce à ce modèle d'étude, nous avons pu mettre en évidence, dans le chapitre I de ce travail, que l'insertion de Bax dans un environnement membranaire n'est pas un processus spontané, mais pourrait nécessiter la participation d'un partenaire mitochondrial.

Dans la suite de ce travail, notre objectif est de tester l'implication de différents partenaires de Bax et d'élucider les mécanismes par lesquels ils favorisent la translocation et l'insertion de Bax dans un environnement membranaire.

Les données de la littérature présentées plus hauts, nous ont convaincu que TOM22 pouvait être un partenaire essentiel dans les processus menant à l'adressage, l'insertion et l'organisation de Bax dans un environnement membranaire.

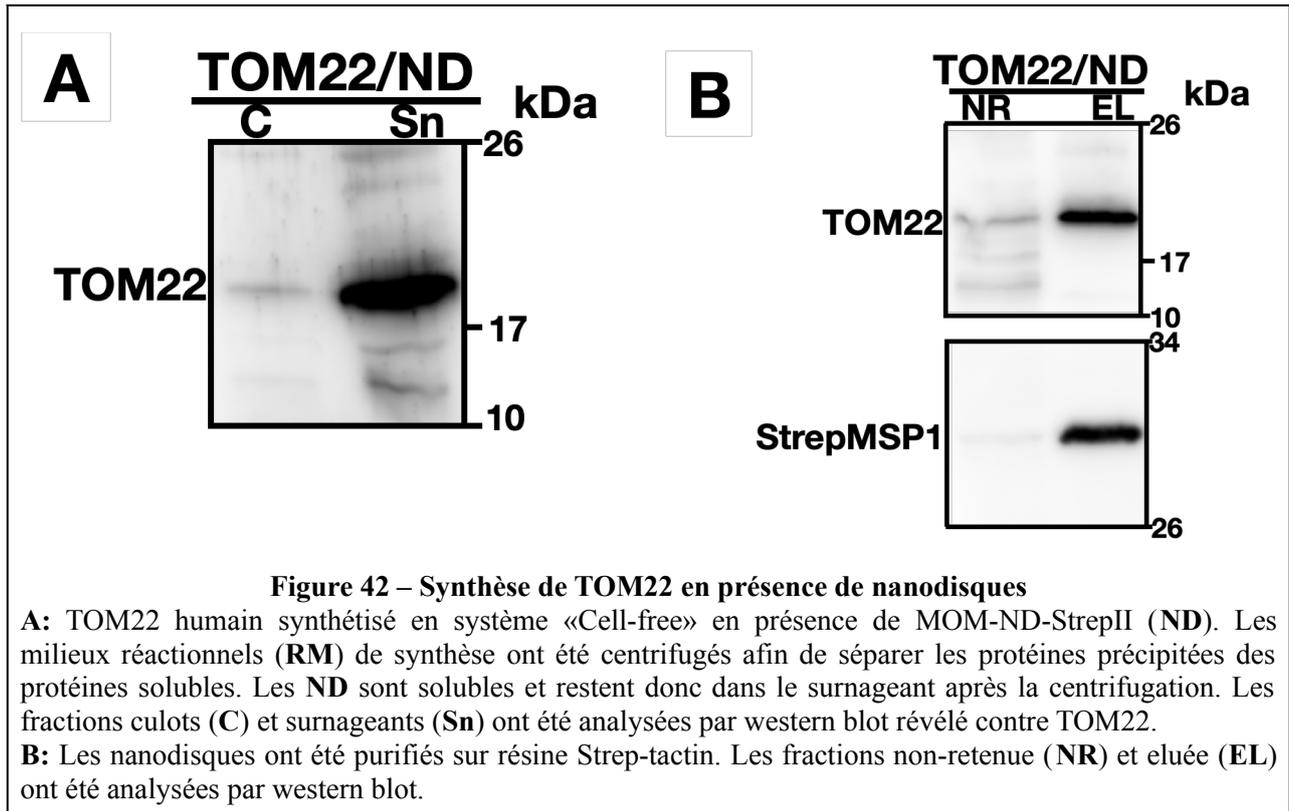
Les deux protéines ont été co-synthétisées dans notre système de production «Cell-free» en présence de nanodisques, puis les caractéristiques de précipitation et d'insertion de Bax dans les nanodisques ont été suivies.

2. TOM22 prévient la précipitation de Bax et stimule son association avec les nanodisques

Comme décrit précédemment, la bicouche lipidique est capable d'induire un changement conformationnel de Bax (**fig 40**). Ce changement conformationnel implique le mouvement de l'ART qui se stabilise dans une conformation conduisant ainsi à l'exposition du domaine «GALLL» de l'hélice $\alpha 1$ de la protéine. L'exposition du domaine "GALLL" entraîne la précipitation d'une partie non négligeable de la protéine. Nous avons montré que les mutations de l'alanine 24 en arginine (A24R) ou celle de la leucine 26 en glutamine (L26Q) préviennent la précipitation de Bax. De façon intéressante, Cartron et al ont montré que des mutations ponctuelles de ces résidus étaient suffisantes pour limiter l'adressage de Bax^{WT} et Bax ^{Ψ} vers la MOM [142]. De plus, une expérience de peptide mapping a montré que le motif «KTGALLLQ» de l'hélice $\alpha 1$ est l'un des domaines impliqués dans l'interaction de Bax avec TOM22 [143].

Ainsi, le domaine "GALLL" impliqué dans la précipitation de Bax suite au changement conformationnel induit par les nanodisques, semble également être un domaine important pour son interaction avec TOM22 [142]. Nous avons émis l'hypothèse que la présence de TOM22 pouvant se lier à ce domaine après son exposition suite au changement conformationnel induit par les nanodisques pourrait prévenir la précipitation de Bax. Nous avons donc co-synthétisé Bax WT et TOM22 WT dans le système «Cell-free» en présence de nanodisques.

Dans un premier temps nous avons testé la production de TOM22 seule, en présence de nanodisques dans notre système de synthèse «cell-free».



Nous avons observé que TOM22 est produite et reste dans le surnageant après l'étape de centrifugation (**fig 42A**). La purification des nanodisques montre que TOM22 est spontanément associée à la bicouche lipidique (**fig 42B**). TOM22 est une protéine transmembranaire insérée grâce à une hélice α hydrophobe (résidus 83-103) et deux parties hydrophiles, cytosolique (résidus 1-82) et intermembranaire (résidus 104-142). Son association spontanée avec les nanodisques est donc cohérente avec son organisation décrite *in cellulo* (**fig 13, cf introduction**).

Nous pouvons donc passer à l'étape suivante qui est de réaliser la co-synthèse de Bax avec TOM22 en présence de nanodisques.

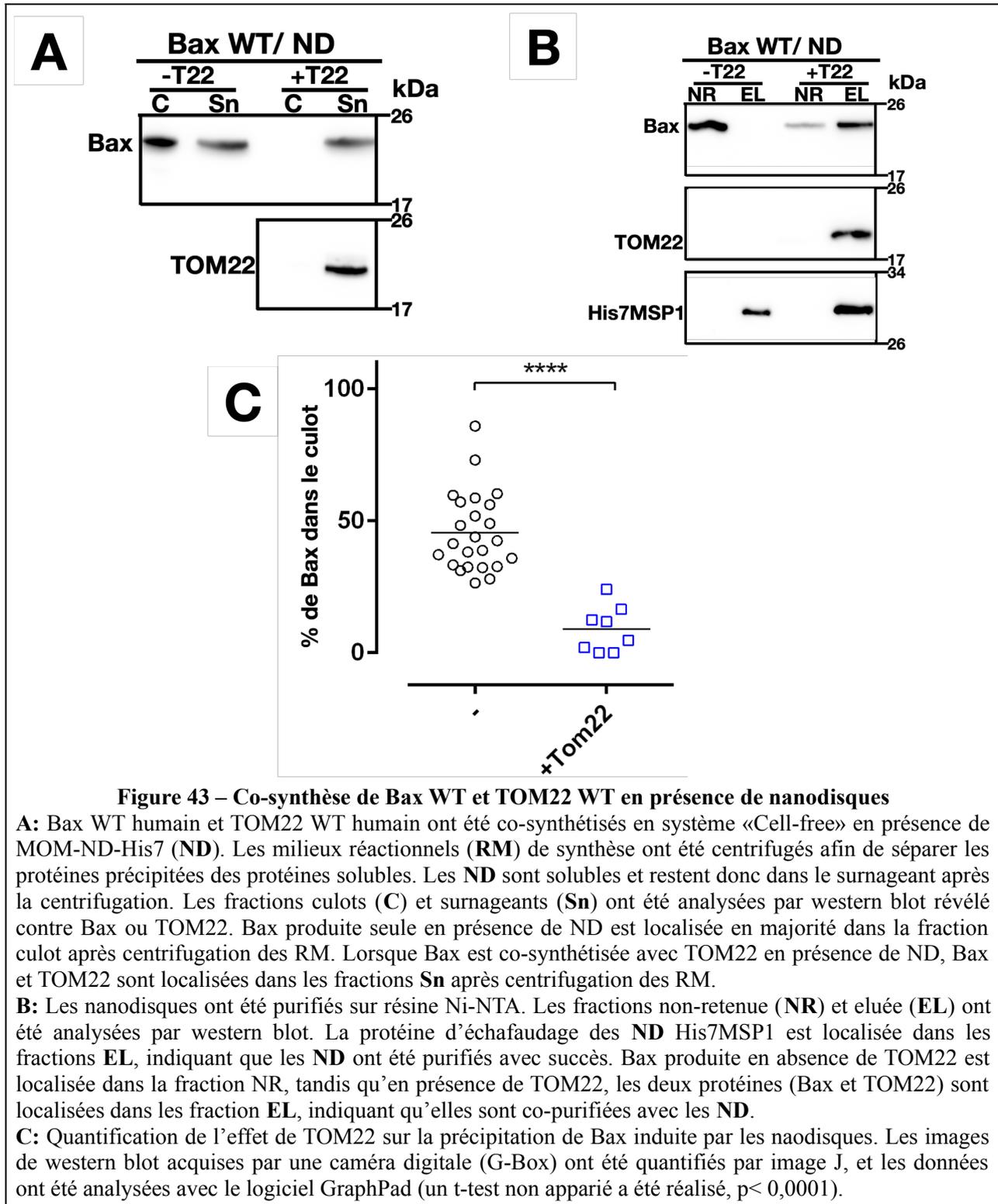


Figure 43 – Co-synthèse de Bax WT et TOM22 WT en présence de nanodisques

A: Bax WT humain et TOM22 WT humain ont été co-synthétisés en système «Cell-free» en présence de MOM-ND-His7 (ND). Les milieux réactionnels (RM) de synthèse ont été centrifugés afin de séparer les protéines précipitées des protéines solubles. Les ND sont solubles et restent donc dans le surnageant après la centrifugation. Les fractions culots (C) et surnageants (Sn) ont été analysées par western blot révéler contre Bax ou TOM22. Bax produite seule en présence de ND est localisée en majorité dans la fraction culot après centrifugation des RM. Lorsque Bax est co-synthétisée avec TOM22 en présence de ND, Bax et TOM22 sont localisées dans les fractions Sn après centrifugation des RM.

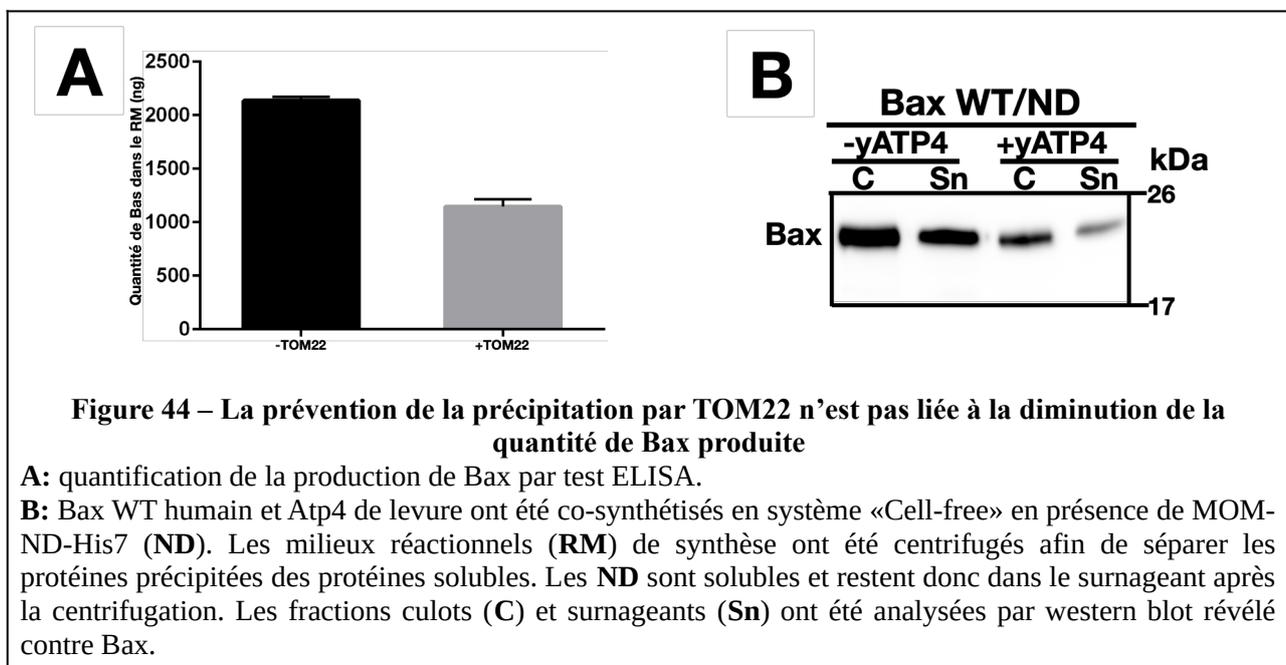
B: Les nanodisques ont été purifiés sur résine Ni-NTA. Les fractions non-retenue (NR) et éluée (EL) ont été analysées par western blot. La protéine d'échafaudage des ND His7MSP1 est localisée dans les fractions EL, indiquant que les ND ont été purifiés avec succès. Bax produite en absence de TOM22 est localisée dans la fraction NR, tandis qu'en présence de TOM22, les deux protéines (Bax et TOM22) sont localisées dans les fraction EL, indiquant qu'elles sont co-purifiées avec les ND.

C: Quantification de l'effet de TOM22 sur la précipitation de Bax induite par les naodisques. Les images de western blot acquises par une caméra digitale (G-Box) ont été quantifiées par image J, et les données ont été analysées avec le logiciel GraphPad (un t-test non apparié a été réalisé, $p < 0,0001$).

La présence de TOM22 prévient la précipitation de Bax induite par les nanodisques (**fig 43A et C**). Nous avons voulu voir si cette protection était liée à une augmentation de l'association de Bax avec les nanodisques. Après purification des nanodisques, nous avons observé que, lorsqu'il est co-

synthétisé avec TOM22, Bax est fortement associé aux nanodisques (**fig 43B**). Ceci suggère que TOM22 stimule l'association de Bax avec les nanodisques.

On peut cependant noter que la co-synthèse avec TOM22 entraîne une réduction d'environ 50 % de la quantité de Bax produite (**fig 44A**). On pourrait donc envisager que la prévention de la précipitation de Bax soit liée à la diminution de sa synthèse. Nous avons donc voulu évaluer cette possibilité en co-synthétisant Bax avec une protéine d'une taille équivalente à TOM22 : la partie cytosolique de la sous-unité 4 de l'ATP synthase de *S. cerevisiae* (Atp4), dont l'absence changeait le comportement de Bax dans la levure [236]. La co-synthèse de cette protéine diminue bien la synthèse de Bax mais ne prévient pas sa précipitation. Ceci suggère que la prévention de la précipitation n'est pas liée à la diminution de la quantité de Bax produite (**Fig 44B**).



TOM22 fait partie du complexe TOM qui comprend d'autres récepteurs, tels que TOM20. Il a été montré que TOM20 était impliqué dans l'adressage mitochondrial de Bcl-2 [140], [139], mais pas de Bax [143]. Nous avons donc voulu vérifier la spécificité de l'effet de TOM22. Nous avons donc co-synthétisé Bax WT et TOM20 en présence de nanodisques.

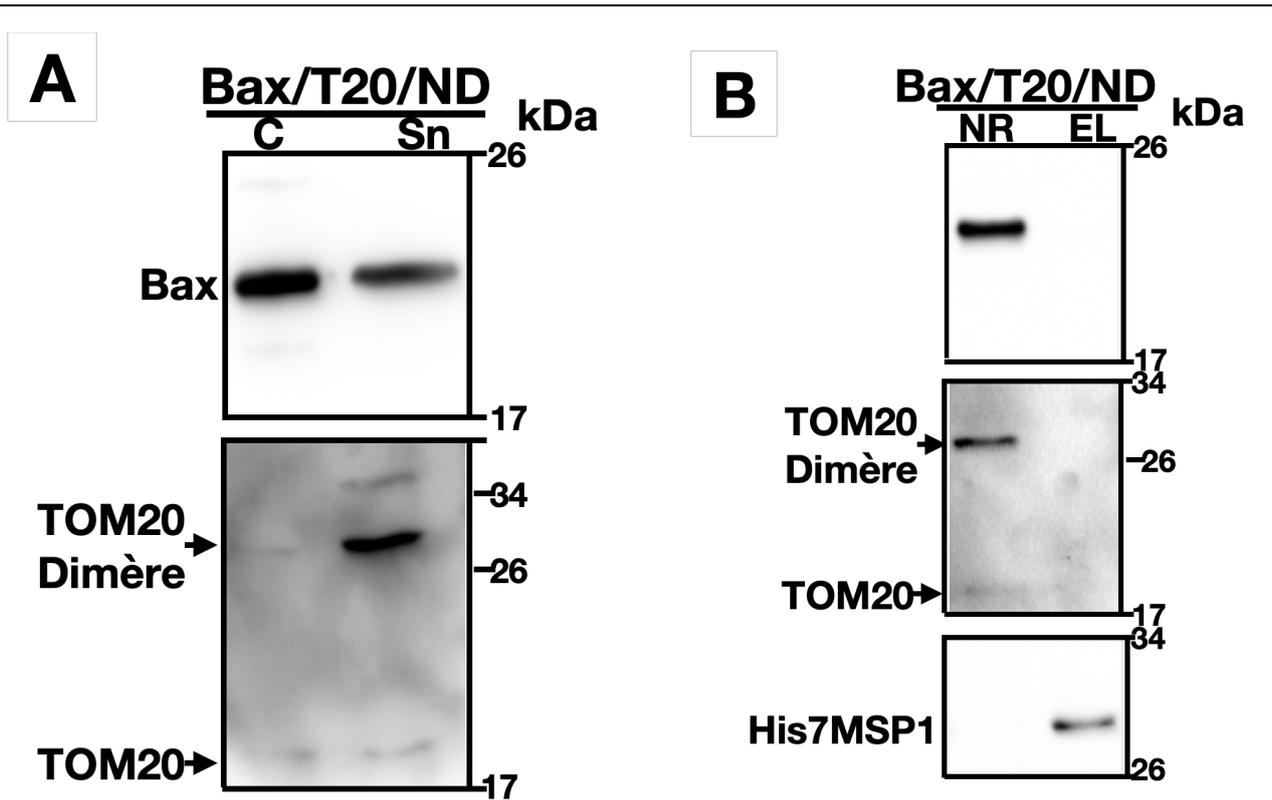


Figure 45 – Co-synthèse de Bax WT et TOM20WT en présence de nanodisques

A: Bax WT humain et TOM20 WT humain ont été co-synthétisés en système «Cell-free» en présence de MOM-ND-His7 (ND). Les milieux réactionnels (RM) de synthèse ont été centrifugés afin de séparer les protéines précipitées des protéines solubles. Les ND sont solubles et restent donc dans le surnageant après la centrifugation. Les fractions culots (C) et surnageants (Sn) ont été analysées par western blot révéler contre Bax ou TOM20. Bax produite seule en présence de ND est localisée en majorité dans la fraction culot après centrifugation des RM.

B: Les nanodisques ont été purifiés sur résine Ni-NTA. Les fractions non-retenue (NR) et éluée (EL) ont été analysées par western blot. La protéine d'échafaudage des ND His7MSP1 est localisée dans les fractions EL, indiquant que les ND ont été purifiés avec succès.

Contrairement à TOM22, TOM20 ne prévient pas la précipitation de Bax induite par les nanodisques (**fig 45A**) et ne stimule pas son association avec les nanodisques (**fig 45B**). Cela montre que les effets que nous observons sont bien spécifiques de TOM22.

3. TOM22 stimule l'insertion de Bax dans la bicouche lipidique

Dans le chapitre I, nous avons montré que le domaine «GALLL» dans l'hélice $\alpha 1$ est directement impliqué dans la précipitation de Bax induite par les nanodisques. D'autre part, on sait que ce même domaine «GALLL» est directement impliqué dans l'interaction de Bax avec TOM22 [142], [143].

Les résultats présentés dans la **figure 43** montrent deux effets de TOM22:

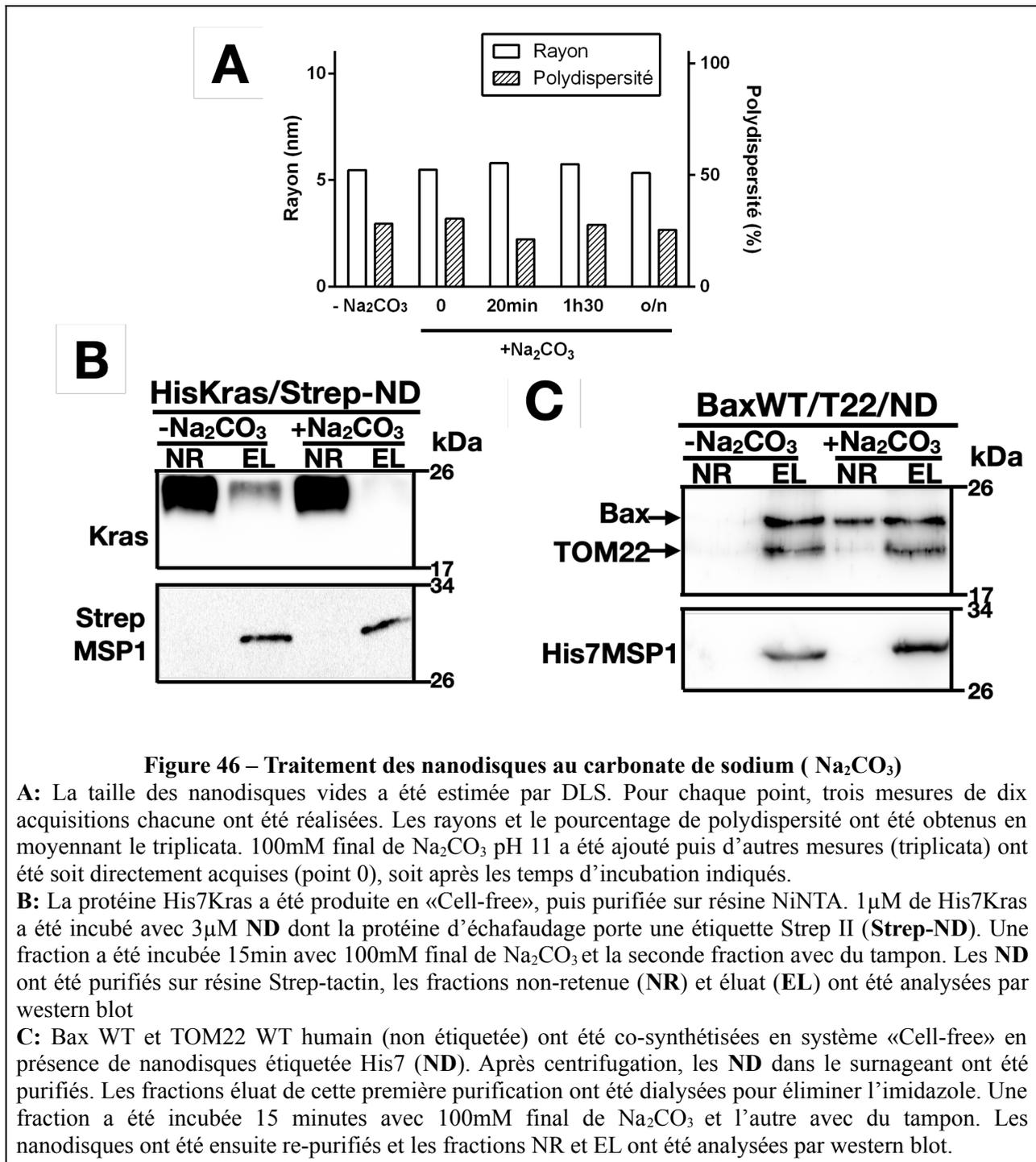
- La prévention de la précipitation de Bax;
- L'augmentation de l'association de Bax avec les nanodisques.

TOM22 étant spontanément associée aux nanodisques (**fig 42B**), on peut alors envisager deux hypothèses:

- Bax est associée aux nanodisques par le biais de son interaction avec TOM22.
- Bax est directement insérée dans la bicouche lipidique.

Pour tester ces hypothèses, nous avons soumis les nanodisques à un traitement alcalin. Ce traitement consiste à utiliser un agent chaotropique, le carbonate de sodium (Na_2CO_3). L'efficacité de cette méthode repose sur le pH alcalin qui diminue les interactions non covalentes protéines-protéines ou protéines-lipides, libérant ainsi les protéines périphériques faiblement attachées à la bicouche sans perturber l'intégrité des membranes [237]. Les protéines étant libérées sous forme soluble, elles sont séparées des fractions membranaires par simple centrifugation. Cette méthode est en général appliquée sur des membranes assez lourdes pour être sédimentées. Dans cette étude, nous avons tiré partie de la possibilité de purification qu'offrent les nanodisques (grâce à la protéine d'échafaudage qui porte une étiquette histidine His7) pour les isoler après le traitement au carbonate de sodium. Ainsi, seules les protéines ancrées dans les nanodisques seront co-purifiées avec ces derniers après le traitement alcalin, les protéines périphériques non insérées directement dans la bicouche lipidique seront décrochées et par conséquent localisées dans les fractions non-retenues.

Les nanodisques étant stabilisés par un dimère de la protéine His7-MSP1E3D1, nous avons dans un premier temps analysé l'effet du traitement alcalin sur leur intégrité. Pour cela, la taille des particules a été analysée par la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS) avant et après le traitement et en fonction du temps.



L’intégrité des nanodisques est maintenue même après plusieurs heures de traitement au carbonate de sodium (**fig 46A**). En contrôle positif, nous avons observé que le carbonate de sodium permet l’extraction de Kras, une protéine connue pour établir des contacts périphériques avec la MOM [238] (**fig 46B**).

De façon intéressante, nous avons observé que, malgré le traitement au carbonate de sodium, Bax reste en majorité co-purifiée avec les nanodisques lorsque TOM22 est présente (**fig 46C**). De plus,

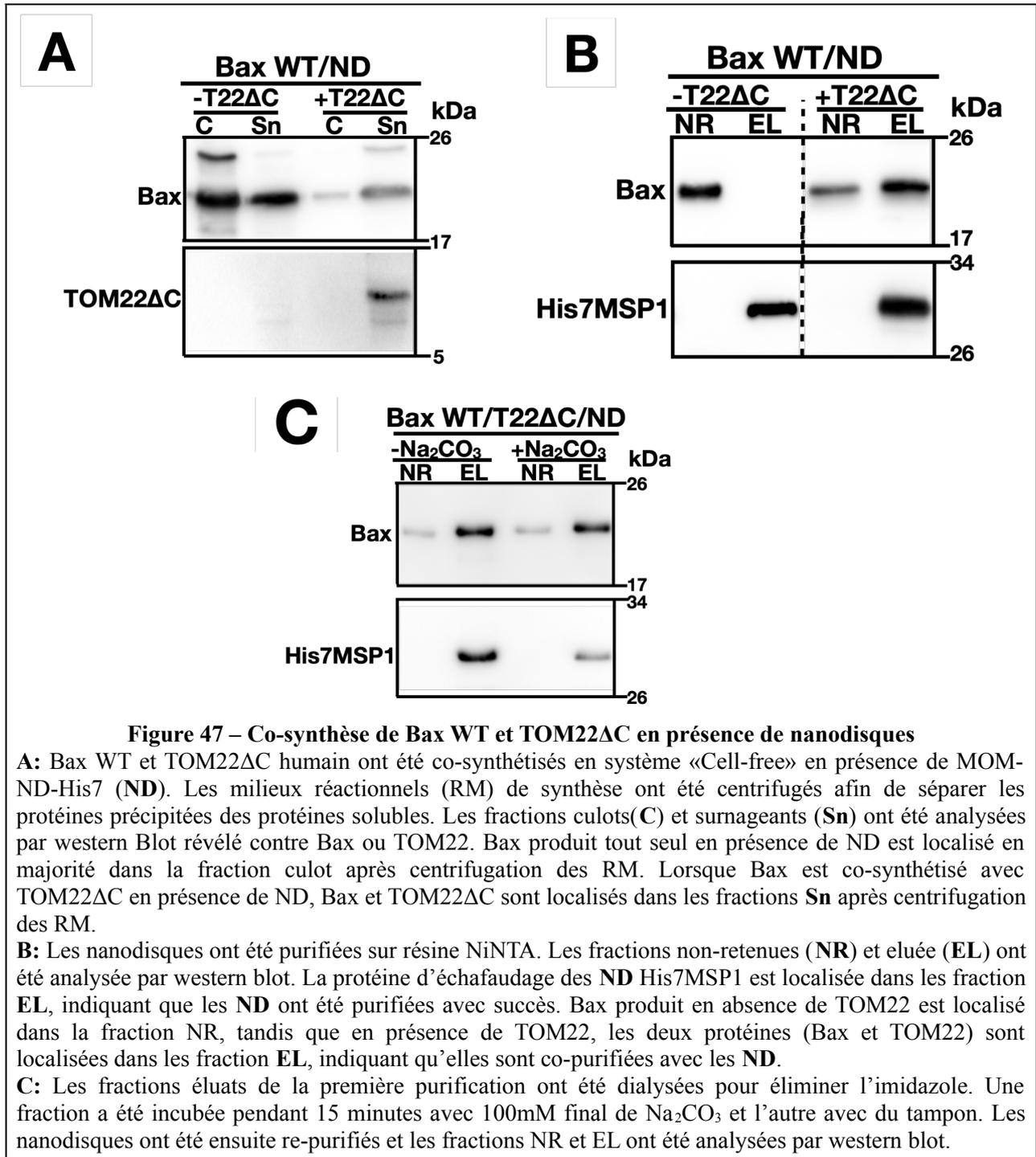
TOM22, connue comme étant une protéine transmembranaire, reste également totalement co-purifiée avec les nanodisques après traitement (**fig 46C**) . Les deux protéines sont donc directement insérées dans la bicouche lipidique. Bellot et al (2007) avaient proposé que TOM22 était le récepteur mitochondrial permettant le recrutement de Bax dans la MOM [143]. Nos expériences montrent que non seulement TOM22 recrute Bax dans les nanodisques, mais que, de plus, il favorise l'insertion directe de Bax dans la bicouche lipidique.

4. TOM22 induit un changement conformationnel de Bax

Bax étant une protéine soluble, son insertion dans une membrane requiert de profonds changements conformationnels.

Bien que la majorité de Bax soit insérée dans les nanodisques en présence de TOM22, il n'en reste pas moins qu'une partie non négligeable de Bax est extraite par le carbonate de sodium (**fig 46C**). Cette population de Bax qui n'est pas directement insérée dans la bicouche lipidique est donc initialement co-purifiée avec les nanodisques *via* l'interaction avec TOM22. Le carbonate de sodium permettant de rompre les interactions protéines/protéines, cette fraction de Bax en interaction avec TOM22 se retrouve par conséquent détachée des nanodisques. Cette observation nous permet d'émettre une hypothèse sur la nature de l'interaction Bax/TOM22. Cette interaction serait un phénomène transitoire («touch and run») durant laquelle TOM22 induirait un changement conformationnel de Bax nécessaire et suffisant à son insertion dans les nanodisques.

Si cette hypothèse est vraie, on pourrait s'attendre à ce que l'insertion de TOM22 dans les nanodisques ne soit pas un prérequis à l'insertion de Bax. Nous avons donc co-synthétisé Bax WT et une partie du domaine cytosolique de TOM22 (TOM22 Δ C résidus 1-52) en présence de nanodisques.



Nous avons observé que TOM22ΔC prévenait la précipitation de Bax et stimulait sa co-purification avec les nanodisques (**fig 47A et B**). Ainsi, la co-purification de Bax avec les nanodisques ne requiert pas l'insertion de TOM22 dans les nanodisques. Nous avons ensuite soumis ces nanodisques au traitement au carbonate de sodium et observé que Bax reste co-purifiée avec les nanodisques (**fig 47C**). Ceci montre que le domaine cytosolique de TOM22 (résidus 1-52) est suffisant pour induire l'insertion de Bax dans la bicouche.

En outre, les résultats des traitements au carbonate de sodium montrent une différence notable entre les effets de TOM22 et TOM22 Δ C. En effet, une partie non négligeable de Bax est extraite par le carbonate de sodium lorsque TOM22 est inséré dans les nanodisques (**fig 46C**). A l'inverse, TOM22 Δ C induit une insertion totale de Bax (**fig 47C**). Ceci montre que lorsque TOM22 est inséré, une fraction de Bax y reste associée sans être insérée, formant un complexe transitoire Bax/TOM22 avant l'insertion de Bax. Ceci appuie notre hypothèse selon laquelle l'interaction Bax/TOM22 est un phénomène transitoire.

Prises ensemble, ces observations soutiennent qu'une interaction transitoire entre Bax et TOM22 induit un changement conformationnel de Bax permettant son insertion dans la bicouche lipidique [239]. Il est donc légitime de se poser la question de savoir si TOM22 permet l'insertion de Bax sous une forme active, propice à l'oligomérisation de la protéine.

5. Propriétés fonctionnelles de Bax inséré dans la membrane via le changement conformationnel induit par TOM22

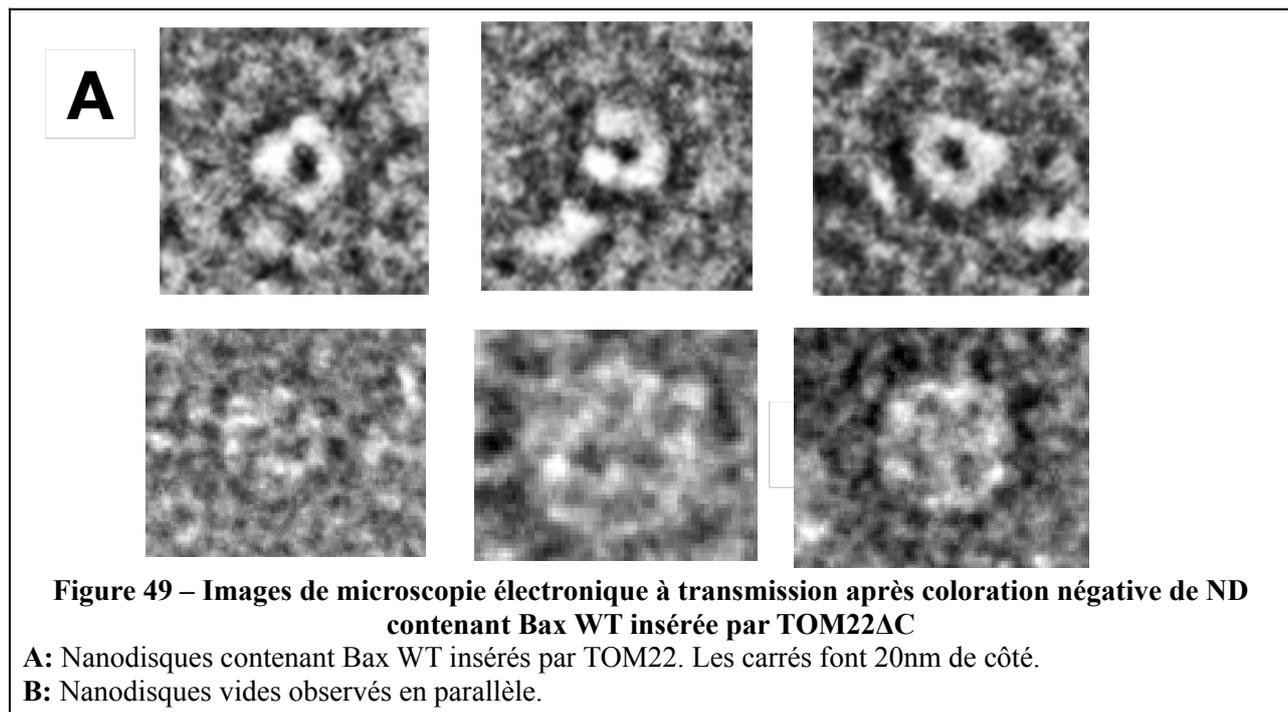
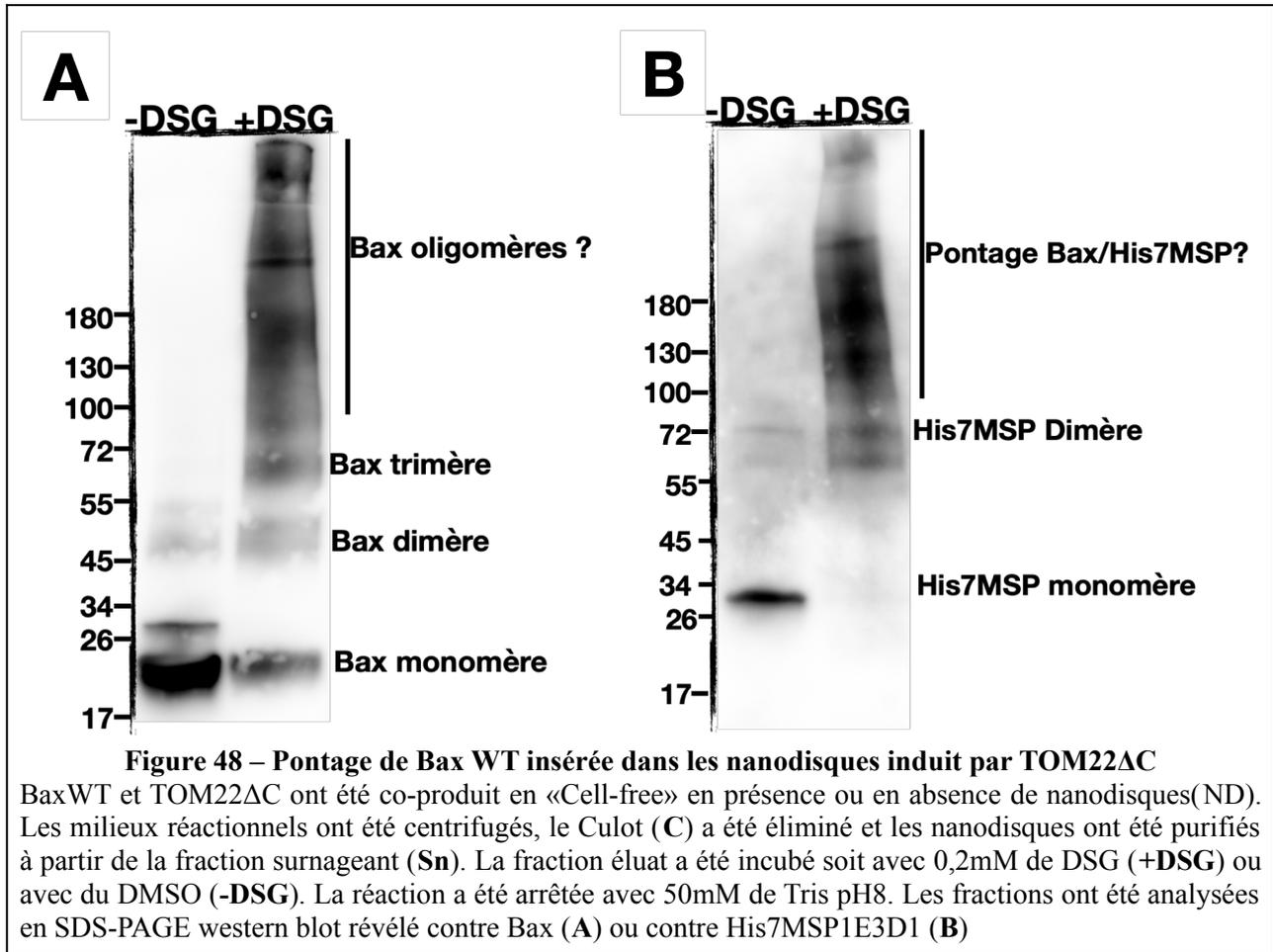
La libération des facteurs apoptogènes tel que le cytochrome c depuis l'espace inter-membranaire des mitochondries représente l'étape de non-retour dans le processus de la voie mitochondriale de l'apoptose. Cette libération du cytochrome c est associée à la formation d'un canal de grande taille, appelé MAC (Mitochondria Apoptosis-induced Channel) dans la membrane mitochondriale externe [188]. Des études électrophysiologiques sur des complexes membranaires isolés à partir de mitochondries issues de cellules traitées à la staurosporine et reconstitués en membranes ont apporté la preuve directe que l'oligomère de Bax est un composant du canal MAC [189].

La question ici est donc de savoir si le changement conformationnel induit par TOM22 promeut l'insertion de Bax dans une conformation propice à l'oligomérisation de la protéine.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des expériences de pontages sur des nanodisques contenant Bax WT dont l'insertion a été stimulée par TOM22 Δ C. Nous avons utilisé un agent pontant de petite taille, le Disuccinimidyl Glutarate (DSG) qui crée des liaisons covalentes entre des résidus lysine dans un rayon maximal de 7,7Å.

Nous avons observé qu'il est possible de stabiliser plusieurs états oligomériques de Bax insérée dans les nanodisques. Nous observons avec certitude des dimères et des trimères. Bax existe probablement dans des états oligomériques supérieurs, mais leur observation est gênée par des pontages parasites entre Bax et la protéine d'échafaudage des nanodisques (His7MSP1E3D1) (**fig**

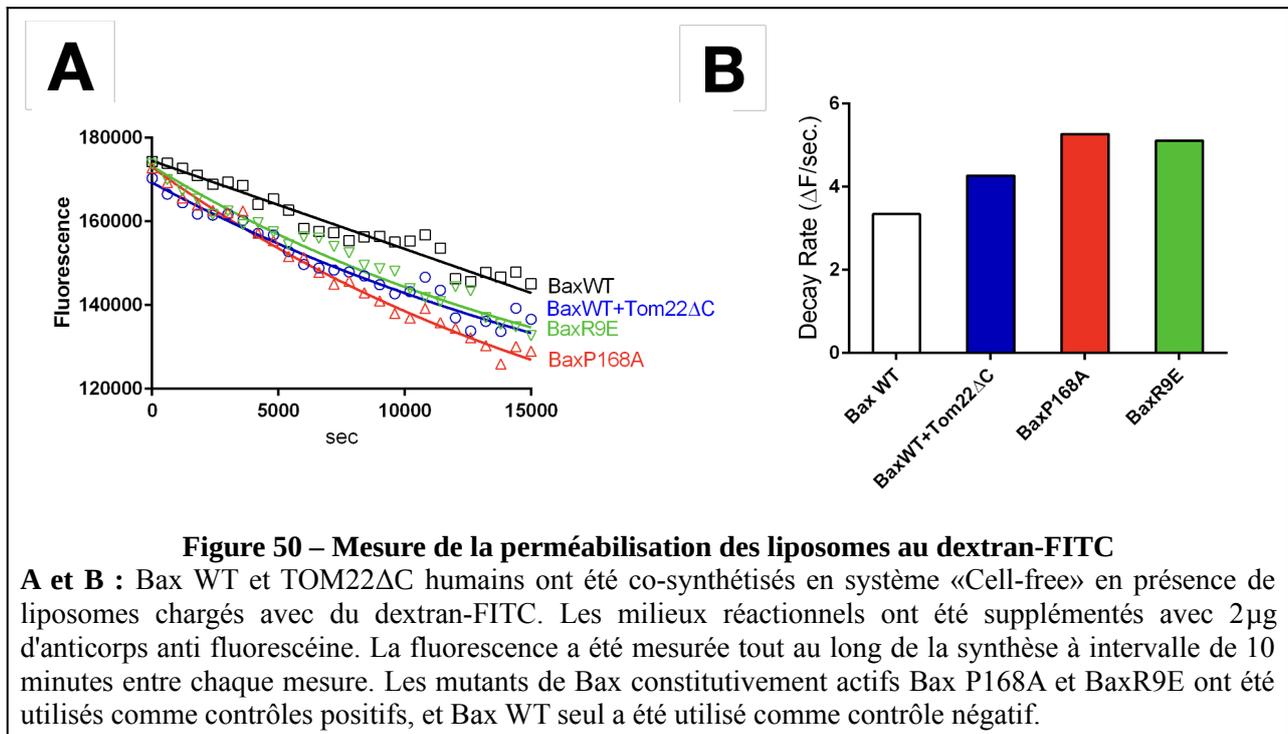
48A et B). Il est donc difficile de conclure sur le degré d'oligomérisation de Bax dans les nanodisques.



Nous avons alors tenté de mettre en évidence la présence d'oligomères en observant ces nanodisques en microscopie électronique à transmission après coloration négative. Nous avons observé que certains de ces nanodisques présentaient des cavités semblables à des pores contrairement aux nanodisques vides utilisés comme témoins (**fig 49A et B**).

Ces résultats suggèrent que le changement conformationnel induit par TOM22 Δ C permet l'insertion de Bax dans une conformation propice à la formation d'oligomères. Les nanodisques ne permettent cependant pas d'obtenir d'information sur la fonctionnalité des pores observés par TEM.

Nous avons alors mis en place un protocole expérimental permettant d'évaluer si le changement conformationnel induit par TOM22 Δ C promeut l'insertion de Bax sous une forme active capable de perméabiliser des liposomes. Pour ce faire, nous avons utilisé des liposomes contenant des molécules de dextran couplé au FITC (Dextran-FITC 10kDa) dont la taille est proche de celle du cytochrome c (12kDa). Le principe de cette expérience est basé sur l'utilisation d'un anticorps anti-FITC. Ce dernier, en se liant au FITC, permet d'éteindre sa fluorescence. Ainsi Bax WT et TOM22 Δ C ont été co-synthétisés en «Cell-free» en présence de liposomes chargés en dextran-FITC. Les milieux réactionnels sont illuminés à fréquence et intensité contrôlée afin d'éviter le photo-blanchiment. La fuite du dextran-FITC se traduira ainsi par une diminution de la fluorescence en fonction du temps. La perméabilisation des liposomes est donc mesurée comme la diminution de la fluorescence en fonction du temps [217], [240].



Lorsque Bax est co-synthétisée avec TOM22 Δ C, une diminution rapide et significative de la fluorescence est observée en comparaison de la condition où TOM22 Δ C est absent (**fig 50A et B**). Cette diminution est comparable à celle induite par les mutants P168A et R9E décrits comme constitutivement membranaires et actifs, c'est-à-dire capable de promouvoir un relargage spontané de cytochrome c dans la levure [165], [157]. Cette observation suggère que le changement conformationnel induit par TOM22 sur Bax lui permet d'acquérir une conformation propice à son insertion sous une forme active, formant un pore capable de laisser passer une molécule de la taille du cytochrome c.

L'ensemble de ces expériences nous permet de conclure que l'interaction entre TOM22 et Bax, permet à cette dernière de s'insérer et de former des oligomères actifs dans un environnement membranaire.

L'existence d'une interaction entre Bax et TOM22 avait été suggérée auparavant par des expériences réalisées *in cellulo* et sur mitochondrie isolées [143]. La complexité de ces systèmes ne permettait cependant pas de mettre en évidence que cette interaction Bax/TOM22 était transitoire et induisait un changement conformationnel de Bax, suffisant pour permettre l'insertion de Bax dans une conformation active.

Dans la suite de ce travail, nous allons nous attacher à identifier les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ce changement conformationnel.

6. Etude des mécanismes moléculaires régissant l'interaction entre Bax et TOM22

Nous avons précédemment montré que la bicouche lipidique induit un changement conformationnel de Bax entraînant l'exposition du domaine «GALLL» de son hélice α 1. L'exposition de ce domaine permet l'interaction de Bax avec TOM22, induisant des changements de conformation permettant *in fine* l'insertion de Bax sous forme d'oligomère actif.

Nous savons que l'interaction est transitoire («touch and run»). Sur cette base, nous avons établi un stratégie pour déterminer la nature des changements conformationnels subis par Bax et la succession d'évènements moléculaires permettant d'acquérir sa conformation active, induits par TOM22.

6.1. Initiation de l'interaction Bax/TOM22

In cellulo, l'interaction Bax/TOM22 n'est détectée que lorsque l'apoptose est initiée [143]. Bax est cytosolique et soluble en condition non apoptotique, et n'est relocalisé vers la mitochondrie que lorsque l'apoptose est déclenchée. La relocalisation de Bax vers la MOM implique l'existence de changements conformationnels pouvant initier l'interaction Bax/TOM22. *In cellulo*, ce premier changement conformationnel de Bax est attribué à ses partenaires tels que les protéines activatrices à domaine BH3 seulement (cBid, Bim ou Puma).

A l'inverse, dans notre système minimaliste, se pose la question de savoir comment l'interaction Bax/TOM22 est initiée. On peut proposer l'hypothèse que l'initiation se fait par l'exposition du domaine «GALLL» induit par la bicouche lipidique.

Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé des co-immunoprécipitations de Bax et TOM22 en absence ou en présence de nanodisques.

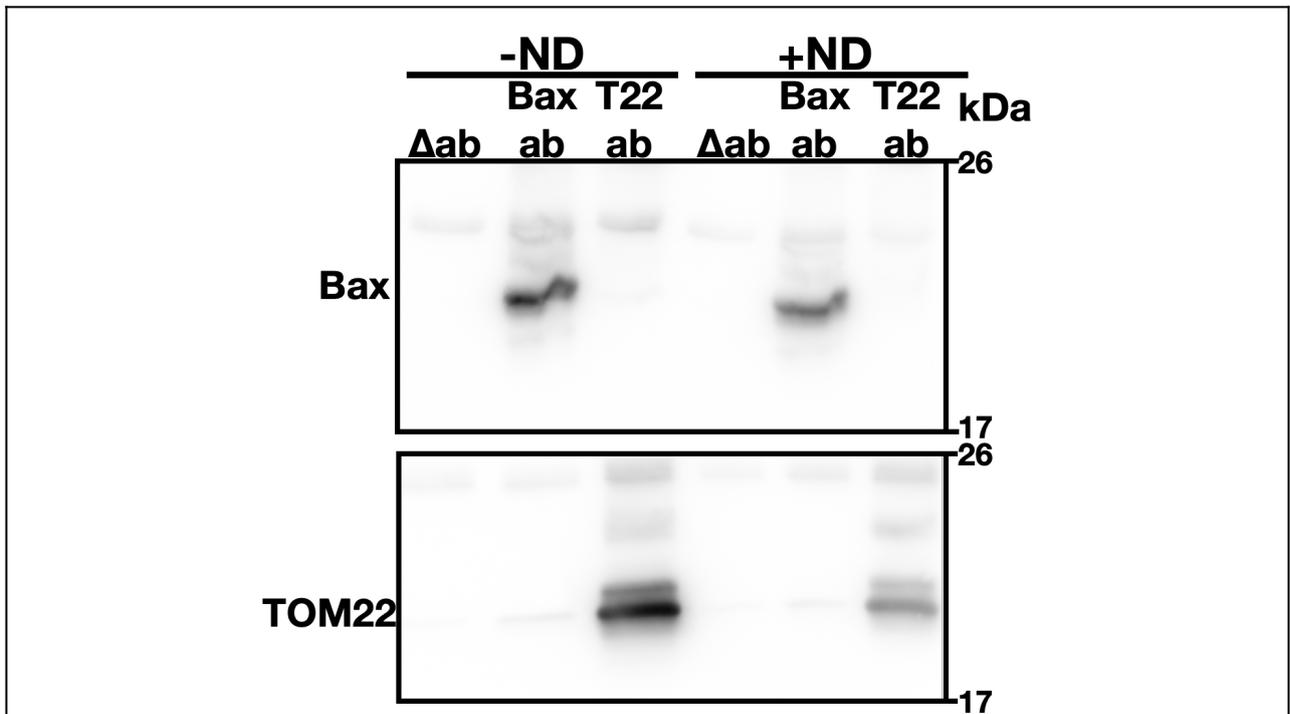


Figure 51 – Co-immunoprécipitation de BaxWT et TOM22 en présence ou en absence de ND

BaxWT et TOM22 ont été co-produites en «Cell-free» en présence ou en absence de nanodisques(ND). Les milieux réactionnels ont été centrifugés, les Culots (C) ont été éliminés et les nanodisques ont été purifiés à partir des fractions surnageants (Sn) de la condition de production en présence de ND. La fraction éluat et la fraction Sn de la condition de production sans ND ont été incubés sur la nuit en présence soit d'anticorps antiBax (Bax ab), soit en présence d'anticorps antiTOM22 (T22 ab) ou sans anticorps (Δab). Les immunoprécipitations ont été réalisé sur des billes d'agarose couplées à la protéine A et analysée par western blot révélé soit contre Bax ou soit contre TOM22.

Si l'exposition du domaine "GALLL" de l'hélice $\alpha 1$ initiait l'interaction entre Bax et TOM22, on devrait pouvoir la détecter en présence de nanodisques mais pas en leur absence.

Nos résultats n'ont pas permis de détecter d'interaction stable entre Bax et TOM22 que ce soit en présence ou en absence de nanodisques (**fig 51A et B**).

L'anticorps anti-TOM22 étant dirigé contre la partie cytosolique de la protéine (contenant le domaine interagissant avec Bax), nous avons également utilisé une version de TOM22 fusionnée à une étiquette HA du côté C-terminal (TOM22HA) qui n'a pas non plus permis de détecter d'interaction stable entre Bax et TOM22 (résultat non montré). Ce résultat négatif n'indique pas forcément que les deux protéines n'interagissent pas mais que l'interaction n'est pas suffisamment stable pour être détectée par co-immunoprécipitation. Ce résultat n'est donc pas incompatible avec notre hypothèse selon laquelle l'interaction Bax/TOM22 est un processus transitoire. Il nous faudra développer des approches plus sensibles pour mettre directement en évidence l'interaction Bax/TOM22.

6.2. TOM22 stimule l'insertion des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 9$ de Bax dans les nanodisques

Notre système *in vitro* nous a permis de mettre en évidence qu'en plus de recruter Bax dans les nanodisques, TOM22 induit un changement conformationnel de Bax. À l'issue de ce changement conformationnel, Bax acquiert une conformation propice à son insertion dans les nanodisques. Nous allons d'abord identifier les domaines de Bax insérés suite à ce changement conformationnel. Nous pourrons ainsi générer des mutations dans ces domaines afin de déterminer les mécanismes moléculaires qui provoquent ce changement de conformation.

Les domaines de Bax impliqués dans son insertion membranaire sont connus. Il s'agit des hélices amphiphiles $\alpha 5$ - $\alpha 6$ organisées en une épingle à cheveux, et de l'hélice hydrophobe $\alpha 9$ C-terminale [241] [192].

Dans le but de mettre évidence l'insertion de ces domaines dans les nanodisques de façon dépendante de TOM22, nous avons réalisé des expériences de mesure d'accessibilité ou d'insertion de l'hélice $\alpha 9$, similaires à celles décrites dans le chapitre I. Pour rappel, le principe de ce procédé consiste à marquer les cystéines non enfouies dans la bicouche lipidique par le N-éthylmaléimide-Polyéthylène glycol (NEM-PEG 5kDa). Le N-éthylmaléimide est un alcène qui réagit avec les thiols et le polyéthylène glycol qui y est greffé augmente relativement la taille de la protéine marquée qui va donc migrer différemment en SDS-PAGE que la protéine non marquée. Bax possède deux cystéines endogènes, la cystéine 62 (C62) dans l'hélice $\alpha 2$ (domaine BH3) et la cystéine 126 (C126) à la fin de l'hélice $\alpha 5$.

Pour mesurer l'insertion des hélices $\alpha 5$ - $\alpha 6$ (organisés en structure à épingle à cheveux), nous avons muté la cystéine en position 62 en sérine (C62) de telle sorte que seule la cystéine 126 située dans l'hélice $\alpha 5$ soit éligible au marquage par le N-éthylemaléimide-Polyéthylène glycol.

À l'inverse, pour mesurer l'insertion de l'hélice $\alpha 9$, nous avons substitué la valine 177 en cystéine (V177C) après avoir muté les deux cystéines endogènes en sérine (C62S et C126S). Cette cystéine étant la seule présente dans ce triple mutant de Bax, son marquage nous donnera des informations uniquement sur l'accessibilité ou l'insertion de l'hélice $\alpha 9$.

Le triple mutant Bax-C62S/C126S/V177C a conservé les propriétés de la protéine Bax WT. En effet, Il n'est co-purifié avec les nanodisques qu'en présence de TOM22 (**fig 52A**). Dans son état soluble, ce mutant réagit avec le NEM-PEG, montrant que la cystéine en position 177 dans l'hélice $\alpha 9$ est accessible en l'absence d'environnement membranaire (**fig 52B, puits «Sn»**).

Comme Bax WT, le triple mutant Bax-C62S/C126S/V177C ne s'insère pas spontanément dans les nanodisques et reste localisé dans la fraction non-retenue (**fig 52B condition «-T22» puits «NR»**). Dans cette fraction, la cystéine 177 dans l'hélice $\alpha 9$ reste marquée par le NEM-PEG (**fig 52B condition «-T22» puits «NR»**), indiquant que les changements conformationnels induits par les nanodisques ne modifient pas la conformation initiale de l'hélice $\alpha 9$ de Bax.

A contrario, En présence de TOM22, Bax subit un changement conformationnel entraînant son insertion dans les nanodisques. Cette fraction de Bax co-purifiée avec les nanodisques de façon dépendante de TOM22 perd la capacité à être marquée par le NEM-PEG (**fig 52B, condition «+T22», puits «EL»**). Cette absence de marquage traduit l'inaccessibilité de la cystéine 177 dans l'hélice $\alpha 9$. Ceci suggère que dans ces fractions de Bax co-purifiées avec les nanodisques, l'hélice $\alpha 9$ est insérée dans la bicouche lipidique, d'où la perte de marquage.

Les mêmes observations ont été faites pour le Bax C62S dont la seule cystéine éligible au marquage est située en position 126 dans l'hélice $\alpha 5$ (**fig 52C**).

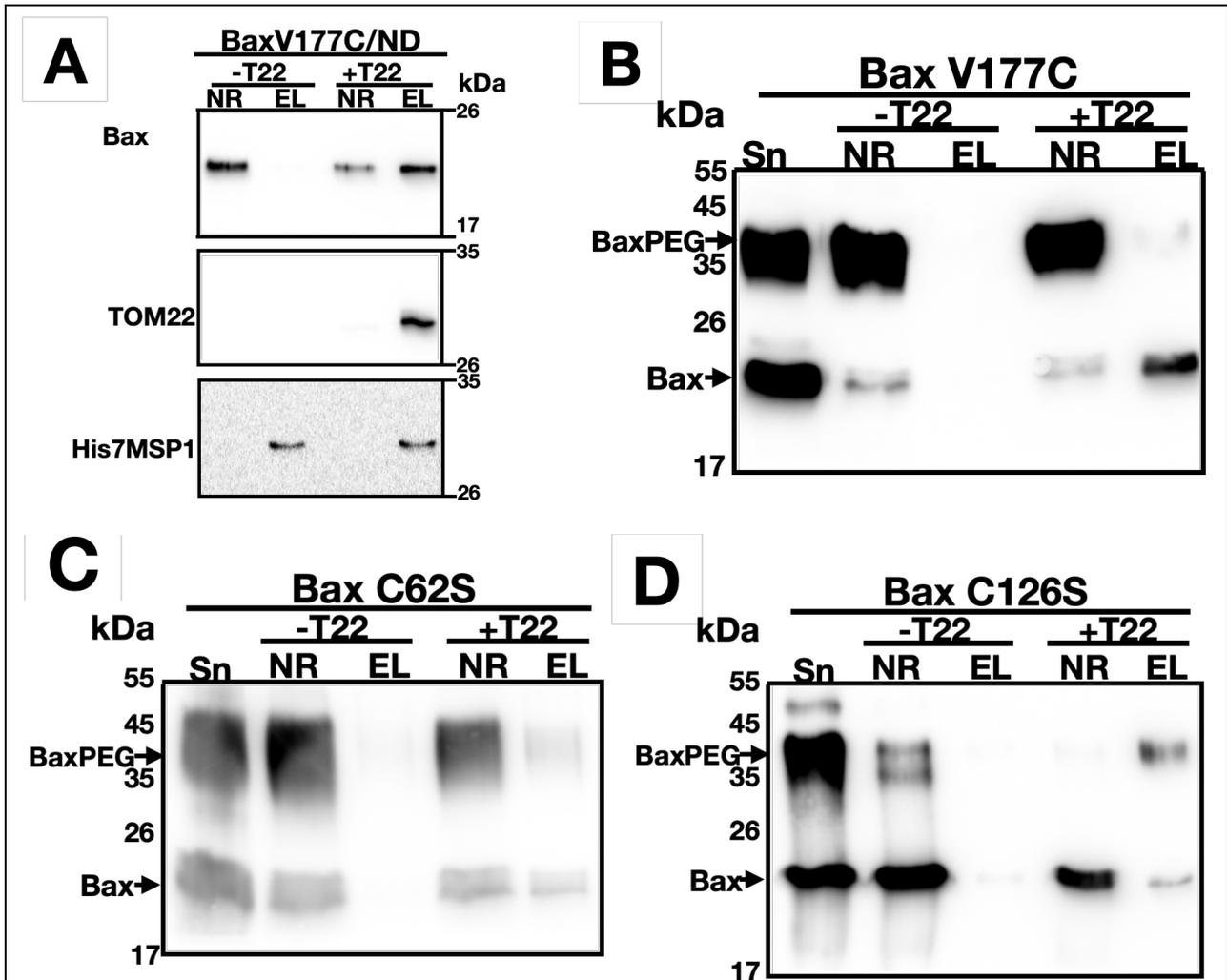


Figure 52 – Détermination des domaines de Bax insérés dans les nanodisques suite à l'interaction avec TOM22

Les différents mutants de Bax C62S, C126S et le triple mutant C62S/C126S/V177C ont été soit produits seuls ou co-produits avec TOM22 en «Cell-free» en présence de nanodisques. Les milieux réactionnels ont été centrifugés, les culots (C) ont été éliminés et les nanodisques (ND) dans les fractions surnageants (Sn) ont été purifiés sur résine NiNTA.

A : Analyse des fractions de la purification des nanodisques issues de la synthèse du triple mutant C62S/C126S/V177C par western blot dirigé contre Bax ou TOM22 ou His7MSP1E3D1.

B, C et D : Les deux fractions issues de la purification des ND, non-retenues (NR) et éluions (EL), ainsi que les fractions surnageants (Sn) des conditions de production en absence de ND ont été incubées avec 0,2mM de N-éthyleMaléimide-Polyéthylèneglycol (NEM-PEG) pendant 1minute. La réaction a été arrêtée avec du N-éthyle Maléimide. Les fractions ont été analysées par western blot révélé contre Bax.

Inversement, lorsque la seule cystéine éligible au marquage est située en position 62 dans l'hélice $\alpha 2$ (domaine BH3), Bax est marquée par le NEM-PEG dans son état soluble (**fig 52D, puits «Sn»**), montrant que cette cystéine est accessible dans la conformation soluble de la protéine. En présence de nanodisques, Bax perd la capacité à être marquée par le NEM-PEG (**fig 52D, condition «-T22» puits «NR»**), ce qui traduit un changement conformationnel limitant l'accessibilité de la cystéine 62 dans l'hélice $\alpha 2$. De façon intéressante, la fraction de Bax insérée dans les nanodisques suite au

changement conformationnel induit par TOM22 est marquée par le NEM-PEG (**fig 52D, condition «+T22» puits «EL»**), ce qui traduit l'accessibilité de la cystéine 62 dans l'hélice $\alpha 2$ dans la conformation membranaire de la protéine.

Pris ensemble, ces résultats confirment l'existence d'un changement de conformation de Bax induit par TOM22, et suggèrent que ce changement conformationnel entraîne l'insertion des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 9$ dans la bicouche lipidique.

6.3. L'insertion de Bax dans les nanodisques est conduite par l'insertion de son hélice $\alpha 9$ C-terminale

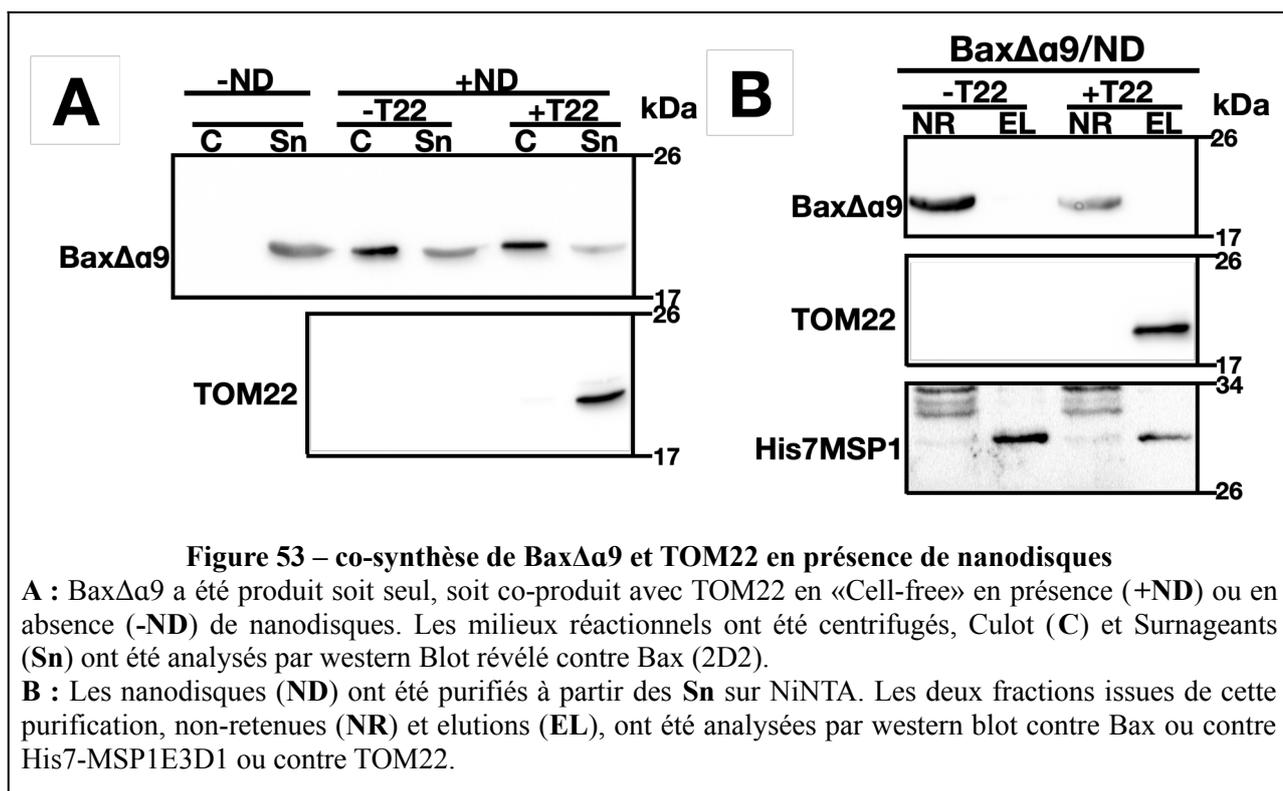
Les résultats de marquage des cystéines suggèrent que TOM22 permet l'insertion de l'hélice $\alpha 9$ de Bax. Cette observation nous a permis d'émettre des hypothèses sur les mécanismes moléculaires pouvant expliquer les changements que Bax subit entre ses conformations soluble et membranaire.

En effet, nous avons montré que l'interaction de Bax avec la bicouche lipidique conduit à deux populations distinctes de Bax, chacune ayant une conformation différente de celle de Bax qui n'a pas été en contact avec les nanodisques. La population précipitée a subi un changement conformationnel entraînant l'exposition du domaine "GALLL" de l'hélice $\alpha 1$. La population qui reste soluble a subi un changement conformationnel limitant l'accès à son domaine BH3.

Nous avons montré que le mutant P168A, qui expose l'hélice $\alpha 9$, et le Bax $\Delta\alpha 9$, dépourvu de l'hélice $\alpha 9$, subissent des changements de conformation conduisant à la formation des deux mêmes populations décrites pour BaxWT. De plus, les données de mesures de l'accessibilité de l'hélice $\alpha 9$ ont montré que l'interaction avec les nanodisques ne modifie pas sa conformation (**fig 52B puits «Sn» et puits «NR»**). Prises ensemble, ces informations soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'hélice $\alpha 9$ reste stabilisée dans le sillon hydrophobe même après les changements conformationnels induits par la bicouche lipidique.

Dans cette hypothèse, au moment de l'interaction de Bax avec TOM22, son hélice $\alpha 9$ est localisée dans le sillon hydrophobe. À l'issue de l'interaction avec TOM22, l'hélice $\alpha 9$ s'insère dans la bicouche lipidique. L'interaction de Bax avec TOM22 permettrait alors le délogement de l'hélice $\alpha 9$ du sillon hydrophobe favorisant ainsi l'insertion de Bax via l'insertion de son hélice $\alpha 9$.

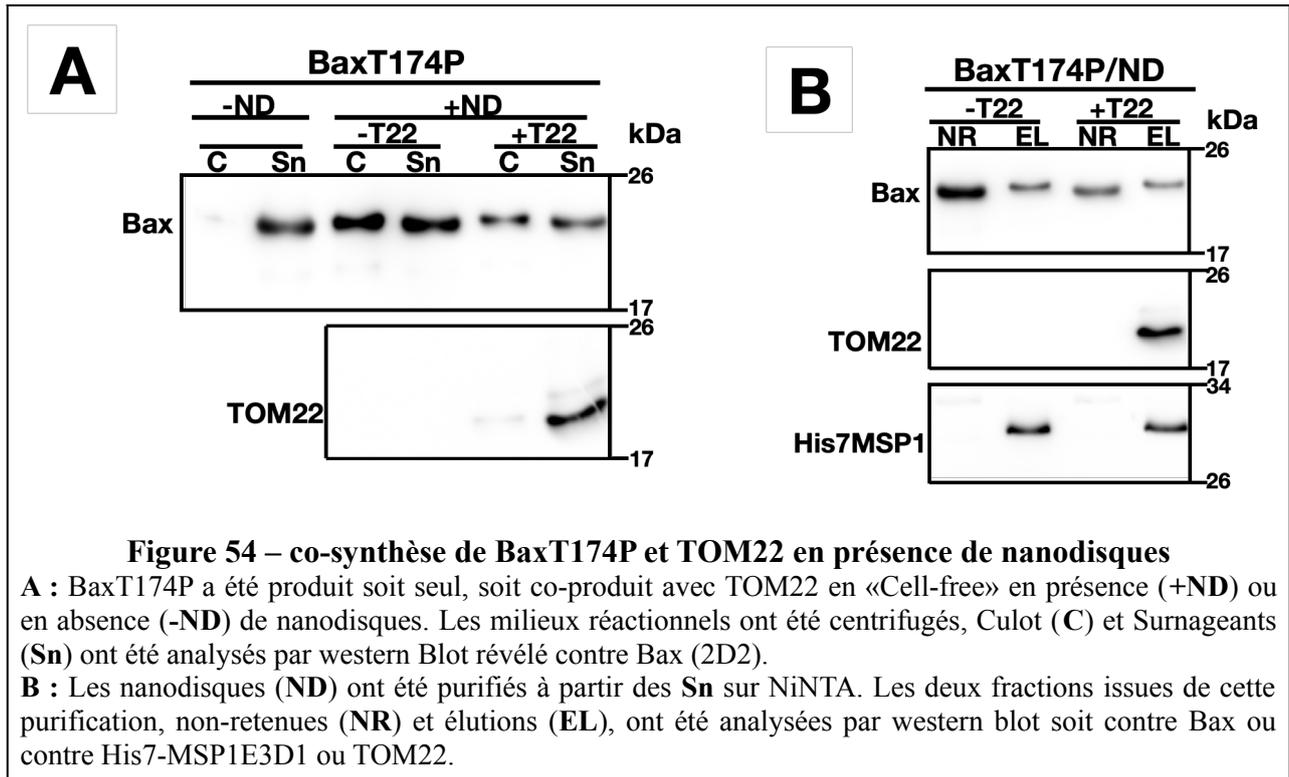
Pour tester cette hypothèse nous avons analysé les effets du changement conformationnel induit par TOM22 sur Bax dépourvue de son hélice $\alpha 9$ (Bax $\Delta\alpha 9$).



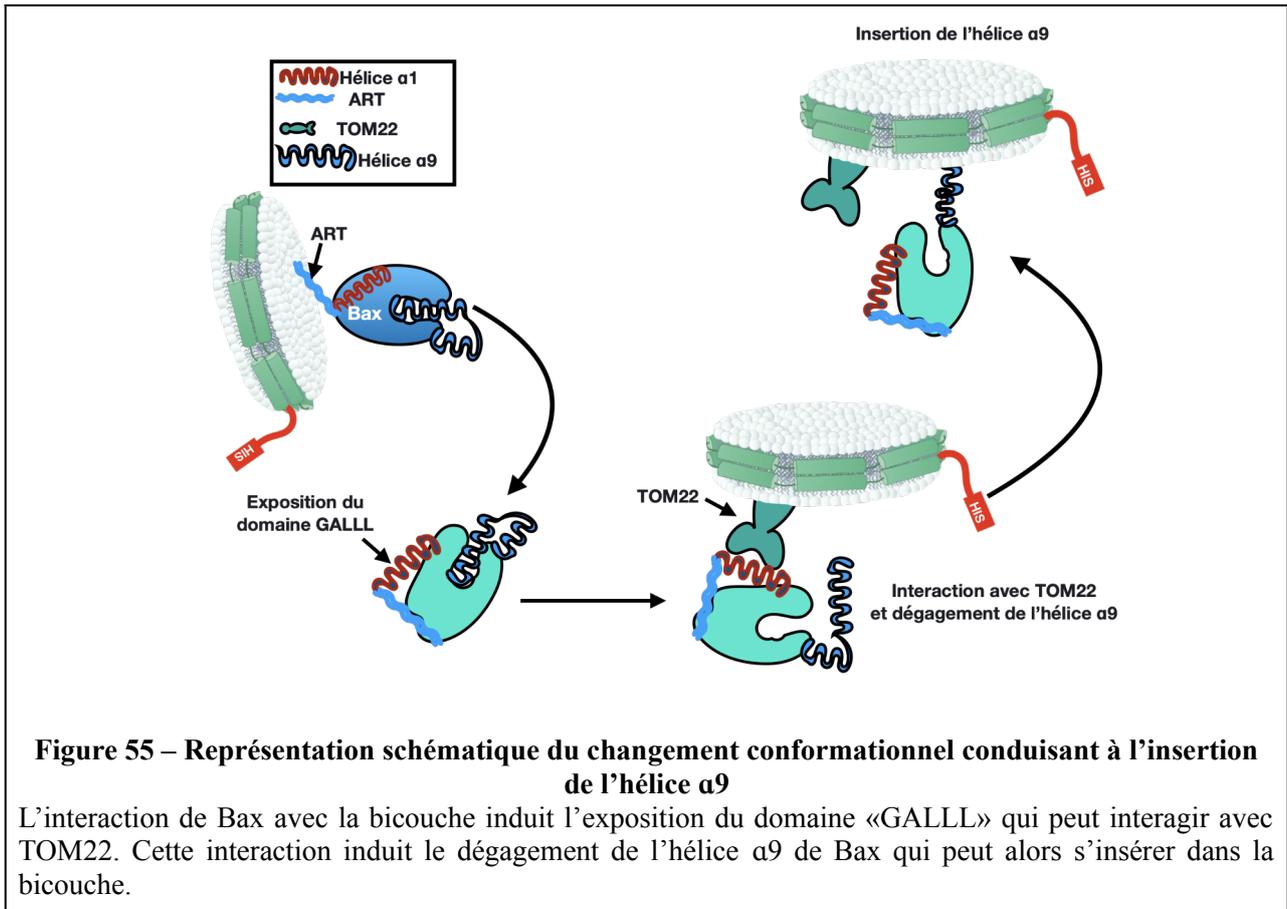
Nous avons observé qu'en absence de l'hélice α9 (BaxΔα9), TOM22 perd la capacité à prévenir la précipitation de Bax et à promouvoir son insertion dans les nanodisques (**fig 53A et B**). Le retrait de l'hélice α9 est donc suffisant pour empêcher l'insertion de Bax malgré la présence de TOM22. Le fait que TOM22 perde la capacité à promouvoir l'insertion de BaxΔα9 suggère que la libération et l'insertion de l'hélice α9 de Bax dans la bicouche lipidique représente l'aboutissement du changement conformationnel induit par TOM22.

Afin d'écartier la possibilité d'un effet indésirable lié à la délétion complète de l'hélice α9, nous avons généré un mutant de Bax dans l'hélice α9 empêchant son insertion. Il s'agit de la substitution de la Thréonine 174 (T174) en Proline (P) (Bax T174P). D'après Suzuki et al (2000), cette thréonine participe à la stabilisation de l'hélice α9 dans la poche hydrophobe par la formation de liaison hydrogène [118]. Par exemple, un mutant Bax T174D est constitutivement membranaire et actif dans la levure, probablement par un effet de dégagement de l'hélice α9 lié à une répulsion entre le D174 et le résidu glutamate en position 69 du domaine BH3, localisé à moins de 3,5Å [155].

De façon intéressante, la substitution de la Thréonine 174 en Proline est la mutation de Bax la plus fréquemment trouvée dans les cancers (catalogue COSMIC) [242]. Il est bien connu que l'introduction d'une proline dans une structure organisée en hélice α déstabilise cette dernière [243]. La substitution de cette Thréonine en Proline devrait donc empêcher l'insertion de l'hélice α9 de Bax dans la membrane.



En absence de TOM22, ce mutant se comporte comme Bax WT : il précipite en présence de nanodisques et reste en majorité non inséré (**Fig 54A et B**). Comme attendu, le mutant T174P se comporte comme Bax $\Delta\alpha 9$ vis-à-vis de TOM22 (**fig 54A et B**) : TOM22 ne diminue pas la précipitation de ce mutant et n'augmente pas son association avec les nanodisques. Ceci confirme que le changement conformationnel de Bax induit par TOM22, consiste en la libération de l'hélice $\alpha 9$ de la poche hydrophobe conduisant à l'insertion de cette hélice dans la bicouche lipidique (**fig 55**).



Ces résultats nous fournissent une vue globale du changement conformationnel de Bax induit par TOM22. Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes mis en jeu, nous allons nous intéresser aux résidus de Bax et de TOM22 impliqués dans ce processus.

7. Identification des résidus impliqués dans l'interaction Bax/TOM22

7.1. Données préliminaires

Nos données suggèrent que le changement conformationnel induit par TOM22 permet de déloger l'hélice 9 du sillon. Dans le but d'obtenir des indices sur les résidus potentiellement impliqués dans l'interaction Bax/TOM22, nous avons réalisé des simulations de «docking» des deux protéines

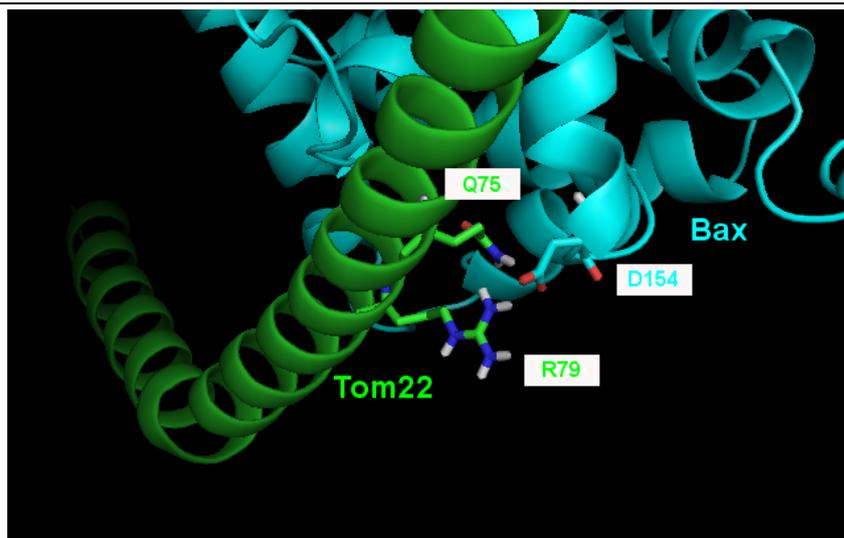
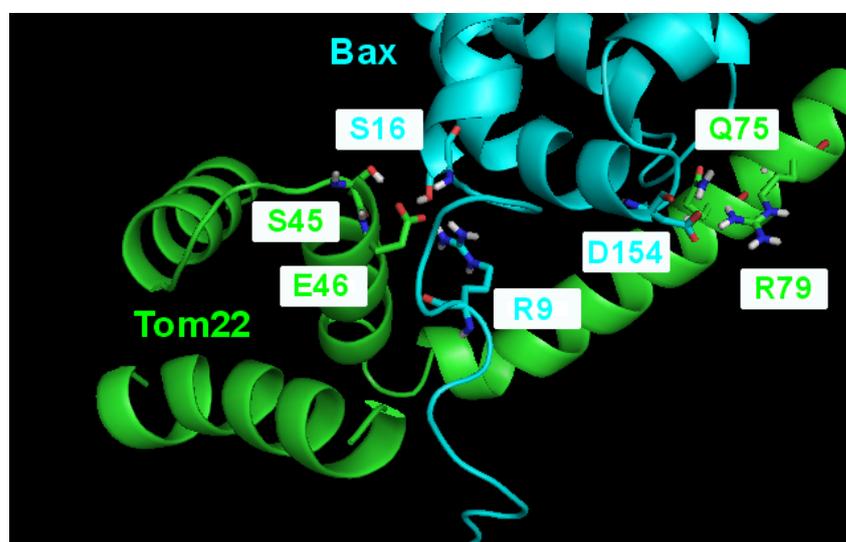
A**B**

Figure 56 – «Docking» Bax/TOM22

A et B: Le docking a été réalisé à l'aide du programme ClusPro 2.0, en utilisant les structures 1F16 de Bax [118] et 7VD2 de Tom22 [293]. Les structures ont été dockées en mode mixte. Le programme donne des prévisions réparties en 26 clusters. Le cluster présenté est celui comprenant le plus de membres, et le troisième meilleur score énergétique [294].

Ce «docking» a permis de mettre en évidence trois résidus de Bax jouant potentiellement un rôle important dans l'établissement et le maintien de cette interaction (**fig 56A et B**).

-L'aspartate 154 (D154) de l'hélice α 7 de Bax qui se trouve à proximité des résidus glutamine 75 (Q75) et l'arginine 79 (R79) de TOM22.

-L'arginine 9 (R9) et la sérine 16 (S16) de l'ART de Bax qui sont à proximité de la sérine 45 (S45) et du glutamate (E46) de TOM22.

D'après la structure de Bax soluble et inactive décrite par Suzuki et al 2000 [118], l'ART apparaît comme un domaine très mobile. Arokium et al ont proposé l'existence de deux conformations

stables sur la base de la formation de liaisons ioniques entre l'ART et l'hélice $\alpha 7$: une position fermée (**fig 57B flèche du bas**) et une position ouverte (**fig 57B flèche du haut**) [157]. Ils ont proposé que la stabilisation de l'ART dépendait du résidu Arg9 (R9). Dans la position «fermée», la charge positive du résidu R9 se trouve relativement proche (7,3Å) de la charge négative du résidu D154 de l'hélice $\alpha 7$ (**fig 57B partie du bas**). Bien que la distance ne soit pas optimale pour établir une interaction ionique stable, elle peut être suffisante pour limiter les mouvements de l'ART.

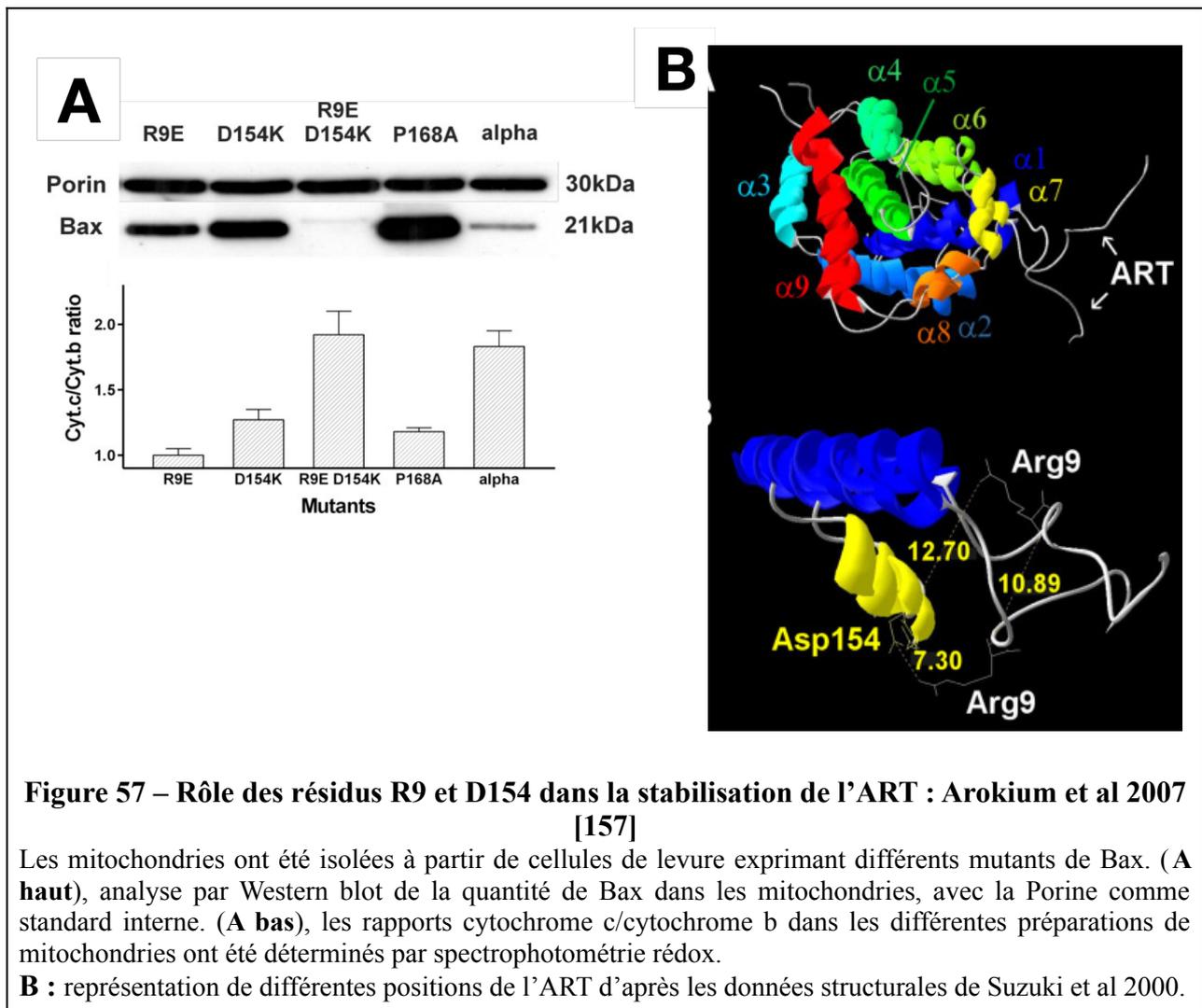


Figure 57 – Rôle des résidus R9 et D154 dans la stabilisation de l'ART : Arokium et al 2007 [157]

Les mitochondries ont été isolées à partir de cellules de levure exprimant différents mutants de Bax. (**A haut**), analyse par Western blot de la quantité de Bax dans les mitochondries, avec la Porine comme standard interne. (**A bas**), les rapports cytochrome c/cytochrome b dans les différentes préparations de mitochondries ont été déterminés par spectrophotométrie rédox.

B : représentation de différentes positions de l'ART d'après les données structurales de Suzuki et al 2000.

Dans la position ouverte, les résidus R9 de l'ART et D154 de l'hélice $\alpha 7$ sont éloignés d'environ 12,7Å rendant impossible l'établissement d'une liaison entre les deux résidus. Ces auteurs ont observé que contrairement à Bax WT, les mutants Bax R9E et Bax D154K étaient constitutivement mitochondriaux et actifs quand on les exprime dans la levure. A l'inverse, le double mutant Bax R9E D154K retrouve le phénotype de Bax WT (**Fig 57A haut**). De plus les deux simples mutants sont capables de perméabiliser la MOM au cytochrome c (**Fig 57A bas**). Ces deux résidus semblent

donc jouer un rôle important dans la stabilité de l'ART de Bax *via* la formation d'une interaction ionique faible. Le fait que ces mutants soient constitutivement mitochondriaux et actifs suggère que la stabilisation de l'ART dans l'une des deux positions décrites joue un rôle important dans la translocation de Bax vers la MOM et donc potentiellement sur l'interaction Bax/TOM22.

De façon intéressante, le «docking» a mis évidence l'implication potentielle de ces deux résidus dans l'interaction de Bax avec TOM22.

Nous avons analysé le comportement de ces mutants dans notre système *in vitro* en présence ou absence de nanodisques ou de leur partenaire TOM22.

7.2. La mutation de l'aspartate 154 (D154) empêche le changement conformationnel induit par TOM22

Les données d'Arokium et al ont mis en évidence que l'inversion de la charge négative de l'aspartate 154 en charge positive de la lysine (D154K) était suffisante pour adresser Bax de façon constitutive à la MOM dans la levure (**fig 57A haut**). Pour mettre en évidence le rôle de TOM22 dans la localisation membranaire de ce mutant, nous avons co-synthétisé Bax D154K et TOM22 en présence de nanodisques.

En absence de TOM22, le comportement du mutant Bax D154K est comparable a celui de Bax WT (**fig 58A**).

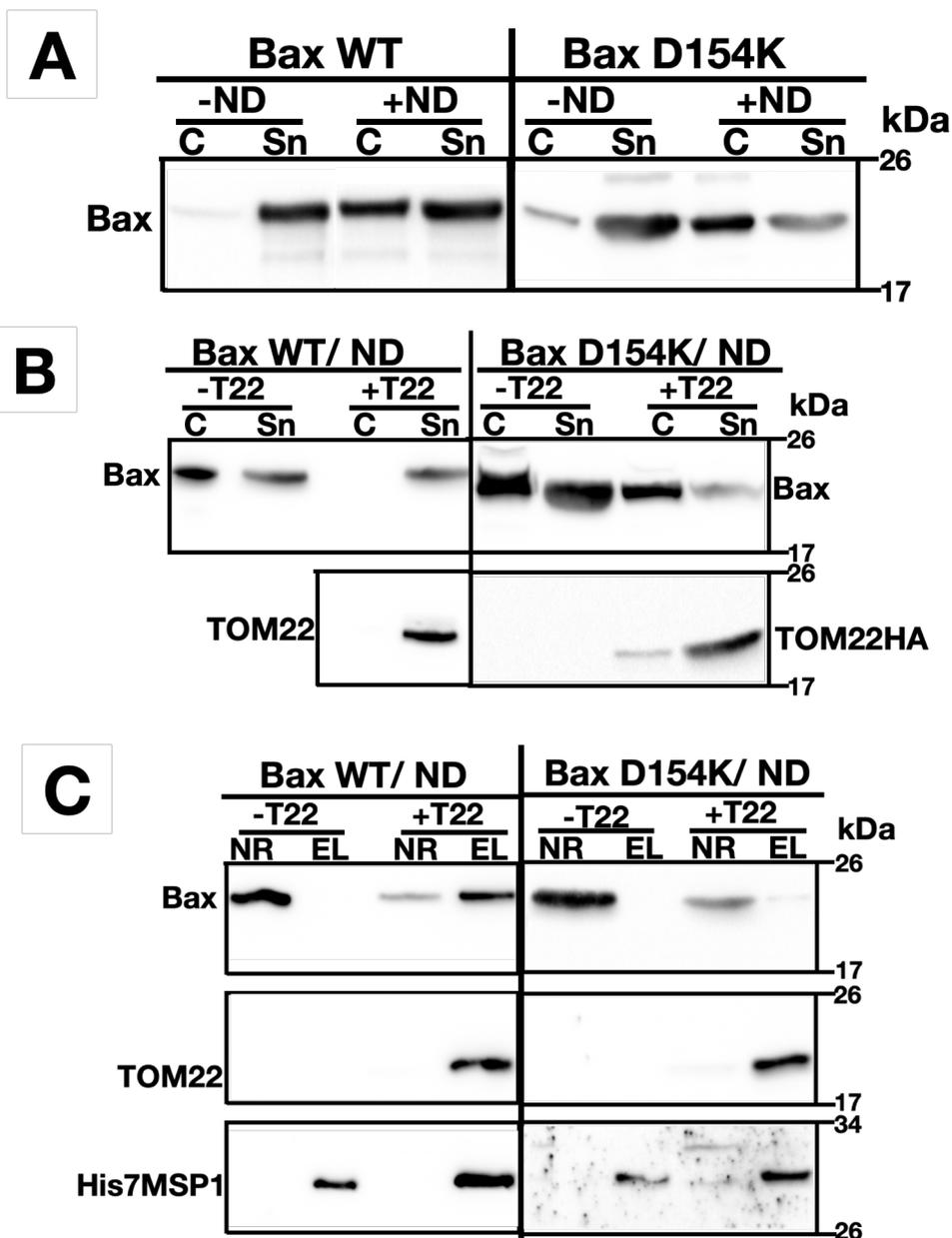


Figure 58 – Co-synthèse de Bax D154K et TOM22 en présence de ND

A et B: BaxD154K a été produit soit seul, soit co-produit avec TOM22 en «Cell-free» en présence (+ND) ou en absence (-ND) de nanodisques. Les milieux réactionnels ont été centrifugés, Culot (C) et Surnageants (Sn) ont été analysés par western Blot révélé contre Bax (2D2).

C: Les nanodisques (ND) ont été purifiés sur à partir des Sn sur NiNTA. Les deux fractions issues de cette purification, non-retenues (NR) et elutions (EL), ont été analysées par western blot soit contre Bax ou contre His7-MSP1E3D1 ou TOM22.

D'après les données d'Arokium et al, l'inversion de la charge négative de l'aspartate D154 en charge positive (D154K) créerait une répulsion avec la charge positive de l'arginine 9 (R9), ce qui signifie que l'ART du Bax D154K serait dans une position ouverte. Le fait que Bax D154K précipite en présence de nanodisques suggère qu'il subit le même changement conformationnel que Bax WT.

Cependant, TOM22 perd la capacité à prévenir la précipitation de Bax D154K et à stimuler son insertion dans les nanodisques (**fig 58B et C**). Deux hypothèses émanent de ces observations :

(i) le mutant Bax D154K a perdu la capacité à interagir avec TOM22, montrant que ce résidu est directement impliqué dans l'interaction Bax/TOM22.

Nous avons réalisé une co-immunoprécipitation entre BaxD154K et TOM22. De façon inattendue, tandis que l'interaction BaxWT/TOM22 est trop instable pour être détectée par immunoprécipitation, nous avons observé que l'immunoprécipitation de TOM22 pouvait entraîner celle de Bax D154K (**fig 59**). Ceci suggère que l'interaction entre Bax D154K et TOM22 est plus stable que l'interaction entre Bax WT et TOM22.

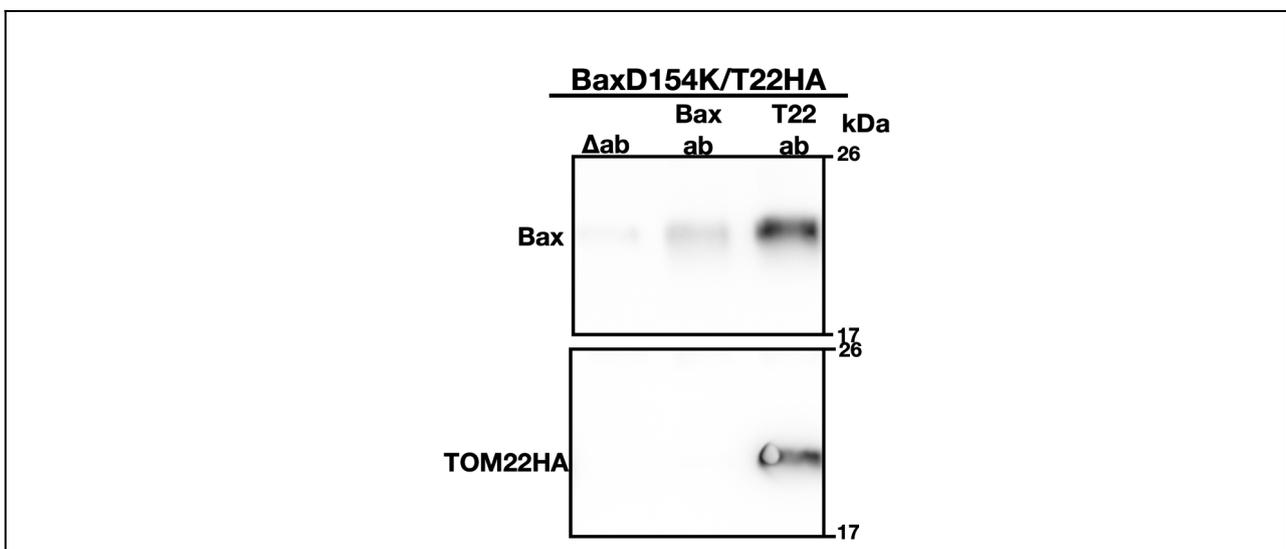
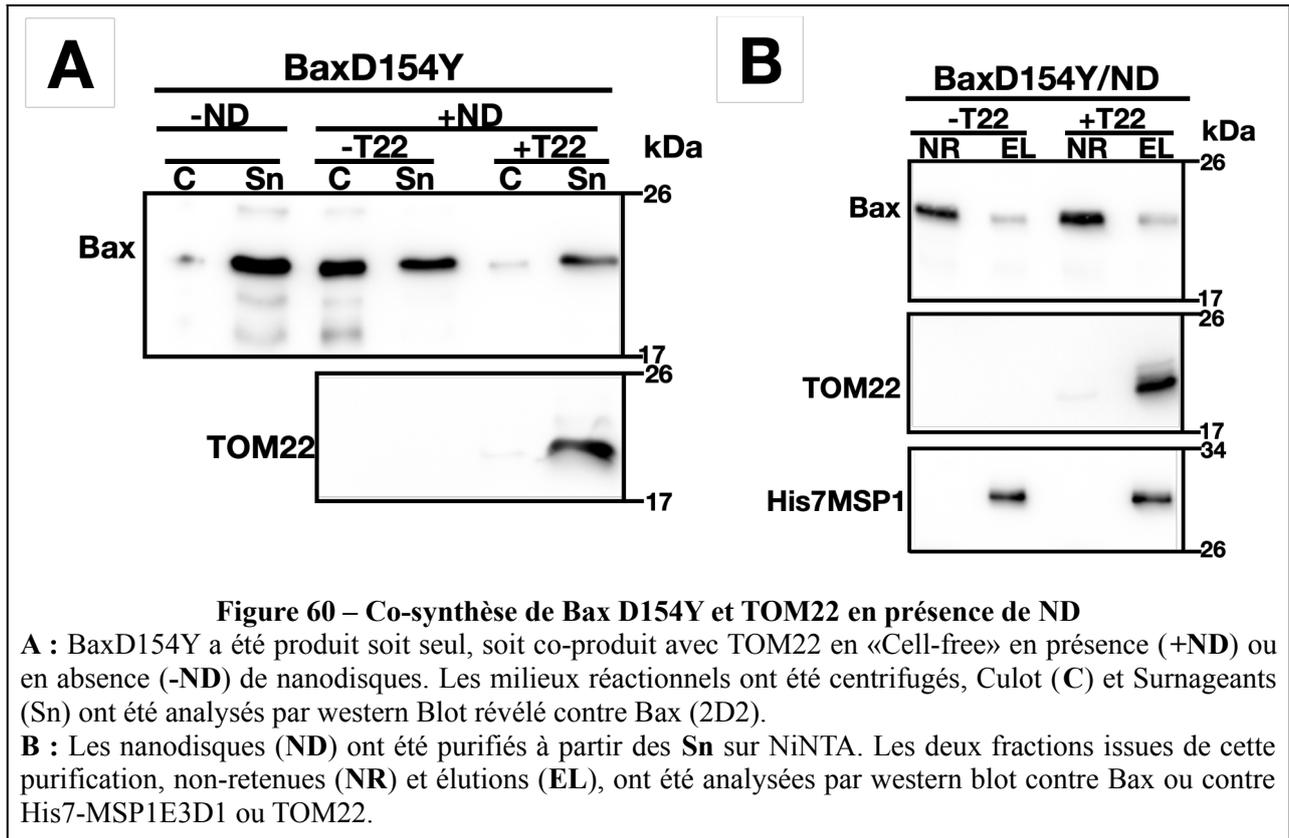


Figure 59 – Co-immunoprécipitation de l'interaction BaxD154K/TOM22 en absence de ND
 BaxD154K a été co-produit avec TOM22HA en «Cell-free» en absence de nanodisques(ND). Les milieux réactionnels ont été centrifugés, les Culots (C) ont été éliminés et les Surnageants (Sn) ont été incubés sur la nuit en présence soit d'anticorps antiBax (**Bax ab**), soit en présence d'anticorps antiHA (**T22 ab**) ou sans anticorps (**Δab**). Les immunoprécipitations ont été réalisées sur des billes d'agarose couplées à la protéine A et analysées par western blot révélé soit contre Bax ou contre HA.

(ii) le mutant Bax D154K n'est plus éligible au changement de conformation induit par TOM22 et permettant son insertion dans les nanodisques. Le résidu D154 participerait alors à la déstabilisation de l'interaction Bax/TOM22 conduisant au changement conformationnel de Bax.

L'analyse de la base de données COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) montre qu'une mutation D154Y est l'une des mutations de Bax les plus fréquentes dans les cancers.

Ceci soutient l'hypothèse d'une potentielle implication de ce résidu dans l'acquisition d'une conformation active de la protéine.

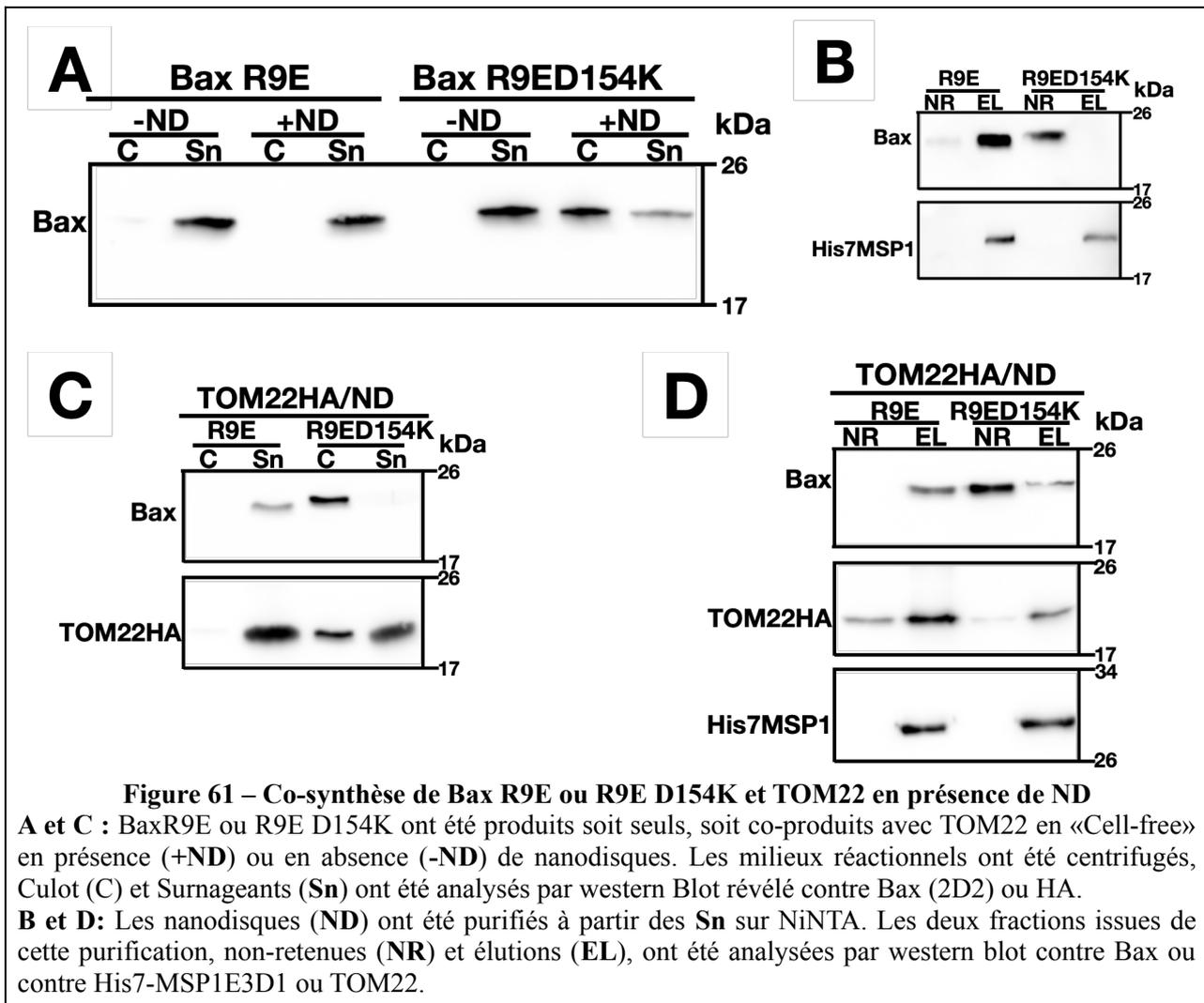


Nous avons donc étudié le comportement de ce mutant dans notre système. Contrairement au mutant Bax D154K, nous avons observé que TOM22 prévient la précipitation de Bax D154Y (**fig 60A**), suggérant que l'interaction de TOM22 avec ce mutant est bien maintenue. Cependant, TOM22 ne stimule pas l'insertion de Bax D154Y dans les nanodisques (**fig 60B**). Cette observation montre que l'interaction Bax/TOM22 seul n'est pas suffisante et qu'une seconde étape de changement conformationnel est nécessaire pour que TOM22 induise l'insertion de Bax dans les ND. Ceci est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle le résidu D154 participe au changement conformationnel induit par TOM22 conduisant à l'insertion de Bax dans les nanodisques.

7.3. La mutation de l'arginine 9 (R9) de l'ART récapitule le changement conformationnel induit par TOM22

Les données d'Arokium et al montrent que l'inversion de la charge positive de l'arginine 9 en charge négative du glutamate (R9E) permet de rompre par répulsion l'interaction entre le R9 et le D154, et ainsi d'adresser constitutivement le mutant Bax R9E à la MOM. De plus, le rétablissement de la liaison ionique par la double mutation R9E D154K permet de rétablir le comportement de Bax

WT dans la levure (**fig 57A**). Pour mettre en évidence le rôle de TOM22 dans la localisation du mutant R9E de Bax dans la MOM, nous avons co-synthétisé Bax R9E ou le double mutant R9E D154K et TOM22 en présence de nanodisques.



De façon intéressante, les nanodisques n'induisent aucune précipitation du mutant Bax R9E. De plus, ce mutant est co-purifié avec les nanodisques, indépendamment de la présence de TOM22 (**fig 61A et B**). Ceci suggère que ce mutant possède une conformation propice à son insertion spontanée dans les nanodisques. De plus, nous avons observé précédemment que ce mutant pouvait perméabiliser des liposomes au dextran-FITC (10kDa) (**fig 50A et B**) montrant qu'il possède une conformation active. Ceci est en accord avec les observations de Arokium et al dans la levure.

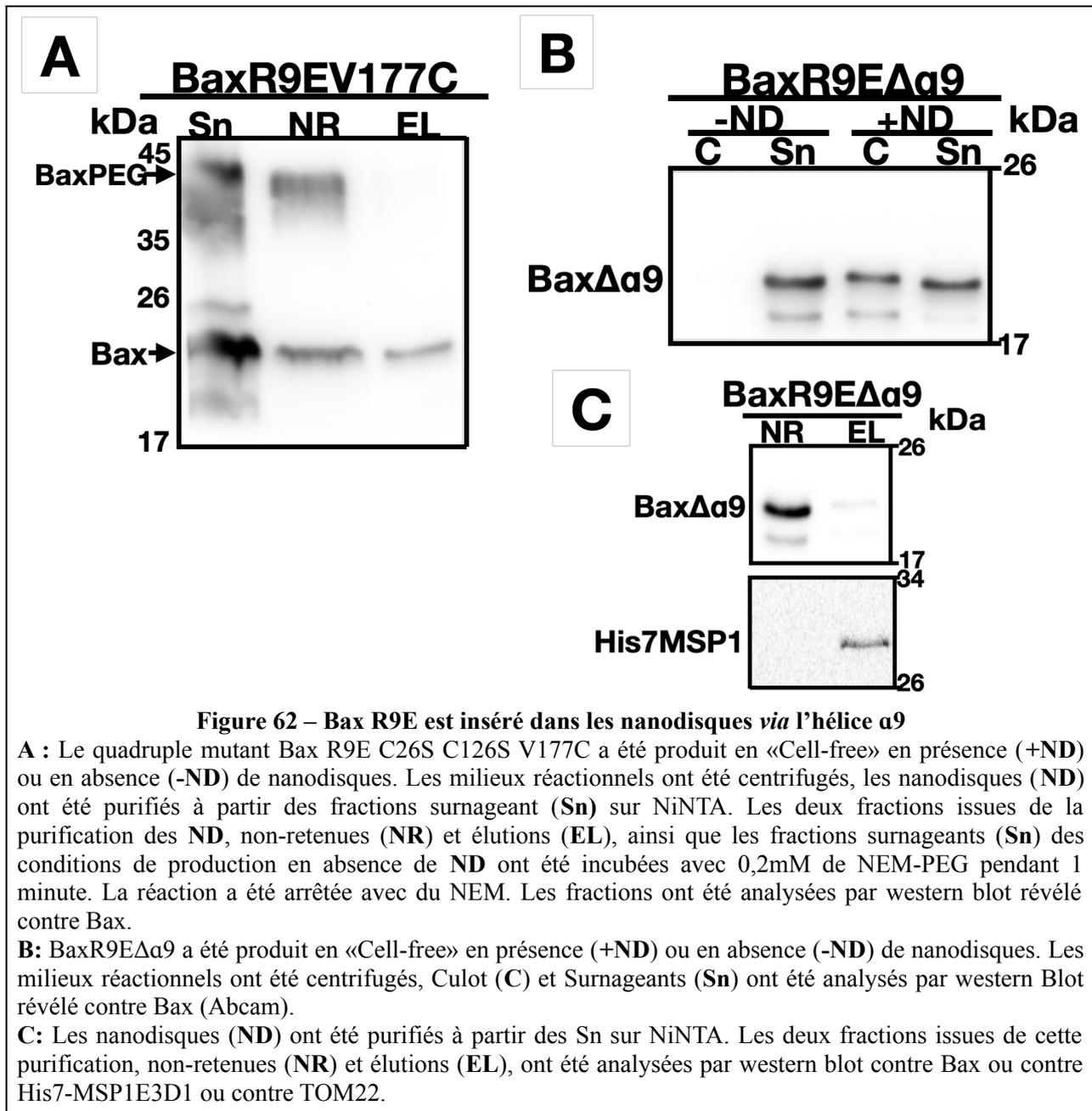
Le double mutant R9ED154K retrouve le comportement de Bax WT. Il précipite en présence de nanodisques et n'est pas co-purifié avec ces derniers (**fig 61A et B**). La présence de TOM22 ne

prévient pas la précipitation du double mutant et ne stimule pas son insertion dans les nanodisques (**fig 61C et D**).

Le fait que le mutant R9E soit constitutivement co-purifié avec les nanodisques suggère que ce mutant de Bax possède une conformation propice à son insertion dans les nanodisques. Les données obtenues jusqu'à présent ont montré que TOM22 induisait un changement conformationnel de Bax promouvant son insertion dans les nanodisques. Ce changement consiste à déloger l'hélice $\alpha 9$ et à permettre son insertion dans la bicouche. Ceci explique pourquoi la délétion de cette hélice dans Bax $\Delta\alpha 9$ entraîne la perte de son insertion malgré la présence de TOM22.

On peut proposer l'hypothèse selon laquelle la mutation R9E récapitule le changement conformationnel de Bax induit par TOM22.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons d'abord mesuré l'insertion de cette hélice dans le mutant Bax R9E. Une cystéine a été placée en position 177 dans l'hélice $\alpha 9$ après avoir muté les deux résidus cystéine endogènes de Bax en sérine.



Bax R9E C26S C126S V177C est marquée dans sa forme soluble et non marquée dans la fraction co-purifiée avec les nanodisques (**fig 62A**). Ceci suggère que l'hélice α9 n'est pas accessible en raison de son insertion dans la bicouche.

Nous avons alors testé l'implication de l'hélice α9 dans l'insertion de Bax R9E en générant une version de BaxR9E dépourvue de cette hélice (BaxR9EΔα9).

Nous avons observé que ce mutant BaxR9EΔα9 précipite en présence de nanodisques (**fig 62B**), suggérant qu'il subit les mêmes changements conformationnels que Bax WT induits par la bicouche lipidique. De plus la délétion de l'hélice α9 C-terminale empêche la co-purification de ce mutant

avec les nanodisques (**fig 62C**), ce qui montre que l'insertion du mutant Bax R9E dans les nanodisques était effectivement conduite par l'insertion de l'hélice $\alpha 9$.

Les conclusions de ces observations sont les suivantes :

- (i) BaxR9E reste soluble malgré l'exposition de son domaine «GALLL» en raison de son insertion spontanée dans les nanodisques (en absence de TOM22);
- (ii) son insertion est dépendante de l'insertion de l'hélice $\alpha 9$ comme celle de Bax WT en présence de TOM22.

Prises ensembles, ces données suggèrent que Bax R9E récapitule de façon constitutive le changement conformationnel de BaxWT induit par TOM22.

Les comportements des mutants D154K, D154Y et R9E ne mettent donc pas en évidence une implication directe de ces résidus dans l'interaction avec TOM22 mais plutôt une implication dans les changements conformationnels subis par Bax.

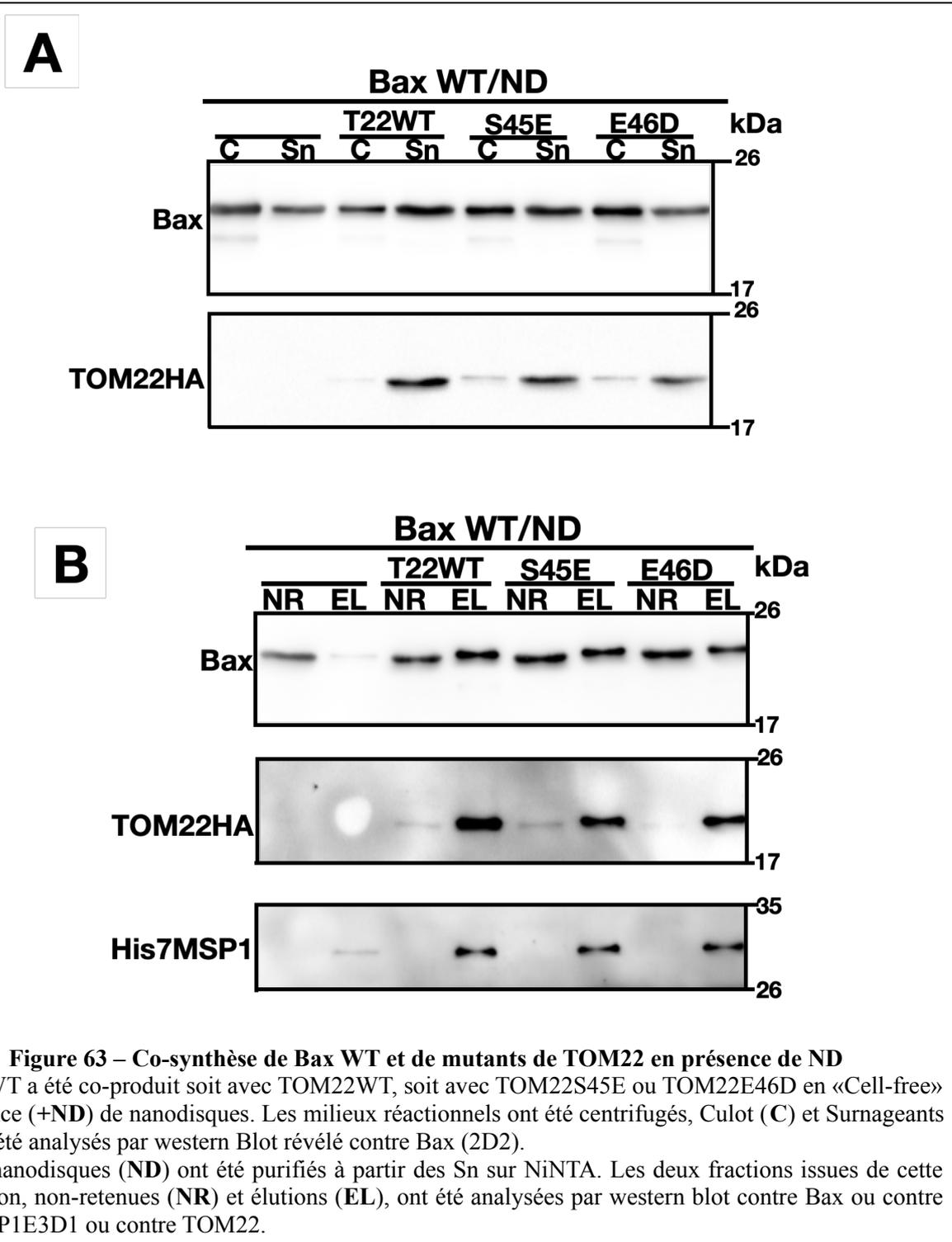
Nous allons donc analyser les autres résidus mis en évidence par le «docking».

7.4. La mutation de la sérine 16 en alanine (S16A) abroge l'interaction Bax/TOM22

Le "docking" Bax/TOM22 a également permis de mettre en évidence une possible zone de contact entre les deux protéines impliquant l'arginine 9 (R9 chargé positivement) et la sérine 16 (S16) de l'ART de Bax, le glutamate 46 (E46 chargé négativement) et la sérine 45 (S45) de TOM22 (**fig 56B**). Les données de la littérature montrent que ces quatre résidus peuvent subir différentes modifications post-traductionnelles. La sérine 45 (S45) de TOM22 est phosphorylable, et est substituée par une thréonine dans certains cancers. D'autre part, le glutamate 46 (E46) est substitué par un aspartate dans certains cancers. Des données obtenues au laboratoire suggèrent que la sérine 16 (S16) de Bax soit potentiellement phosphorylable (Simonyan et Manon, non publié).

Nous avons émis l'hypothèse que l'inversion de la charge négative du glutamate 46 en charge positive de la lysine (E46K) pourrait permettre de rompre l'interaction entre le R9 de Bax et le glutamate 46 (E46) de TOM22.

D'autre part, nous avons mimé la phosphorylation de la sérine 45 (S45) de TOM22 en la substituant par un glutamate (TOM22 S45E).



Les mutants TOM22E46K et TOM22S45E préviennent la précipitation de Bax WT (**fig 63A**) ce qui suggère qu'ils conservent leur capacité à interagir avec Bax. Ces mutants stimulent également la copurification de Bax avec les nanodisques (**fig 63B**), suggérant qu'ils induisent, comme TOM22WT, un changement conformationnel de Bax permettant son insertion.

L'explication la plus évidente est que les simples mutations ne sont pas suffisantes pour rompre l'interaction Bax/TOM22. En effet on peut observer que, dans la même zone, la sérine 16 (S16) est située à proximité de la sérine 45 (S45) de TOM22, ce qui pourrait favoriser la formation d'une liaison hydrogène stabilisant l'interaction Bax/TOM22.

Nous avons alors envisagé que la combinaison de la rupture de cette liaison hydrogène, avec la rupture de l'interaction entre l'arginine 9 (R9) de Bax et le glutamate 46 (E46) de TOM22 permette de rompre l'interaction Bax/TOM22.

Dans le but de rompre cette liaison hydrogène potentielle, nous avons substitué la sérine 16 (S16) de Bax en alanine (Bax S16A).

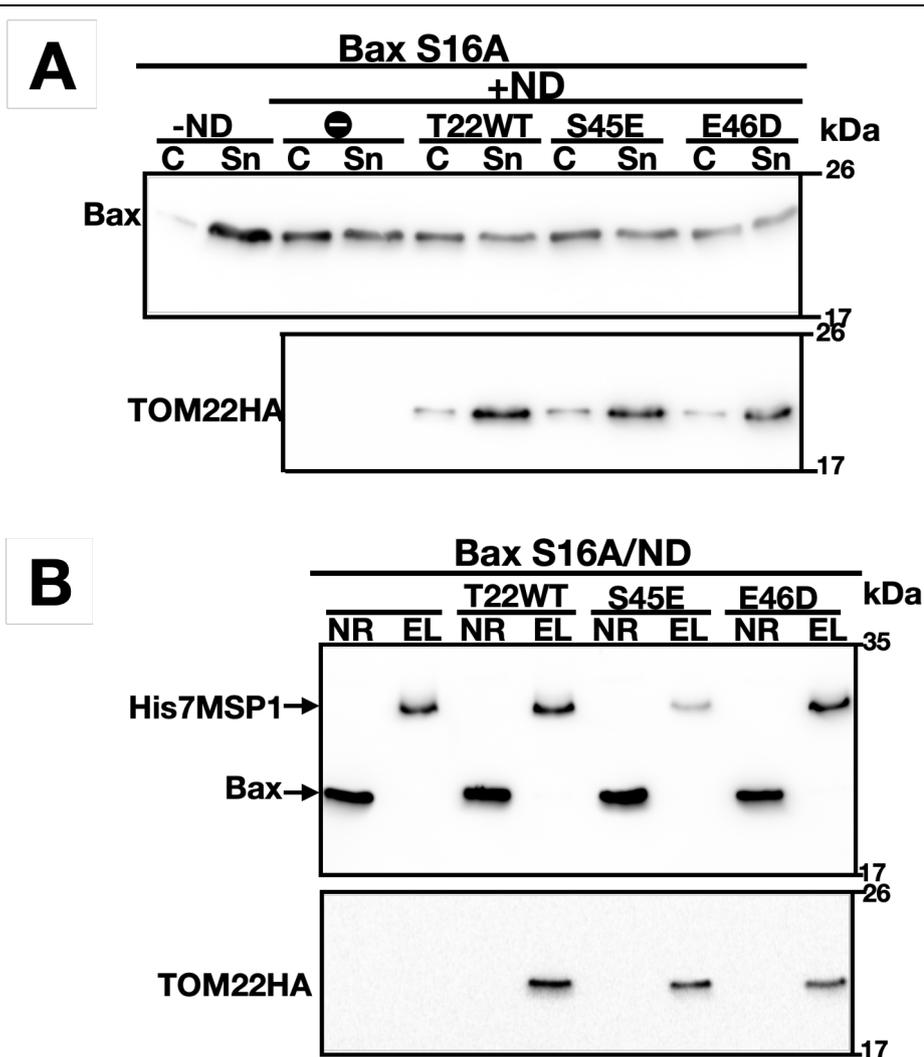


Figure 64 – Co-synthèse de Bax S16A et TOM22 en présence de ND

A : Bax S16A a été co-produit soit avec TOM22WT, soit avec TOM22S45E ou TOM22E46D en «Cell-free» en présence (+ND) de nanodisques. Les milieux réactionnels ont été centrifugés, Culot (C) et Surnageants (Sn) ont été analysés par western Blot révélé contre Bax (2D2).

B : Les nanodisques (ND) ont été purifiés à partir des Sn sur NiNTA. Les deux fractions issues de cette purification, non-retenues (NR) et éluions (EL), ont été analysées par western blot contre Bax ou contre His7-MSP1E3D1 ou contre TOM22.

De façon inattendue, nous avons observé que non seulement les deux mutants TOM22 E46K et TOM22 S45D, mais aussi TOM22 WT, perdent la capacité à prévenir la précipitation de Bax S16A et à promouvoir son insertion dans les nanodisques (**fig 64A et B**).

Le fait que même TOM22 WT ne prévienne pas la précipitation de Bax S16A et ne stimule pas son insertion dans les nanodisques montre que la simple substitution de ce résidu est suffisante pour rompre complètement l'interaction Bax/TOM22.

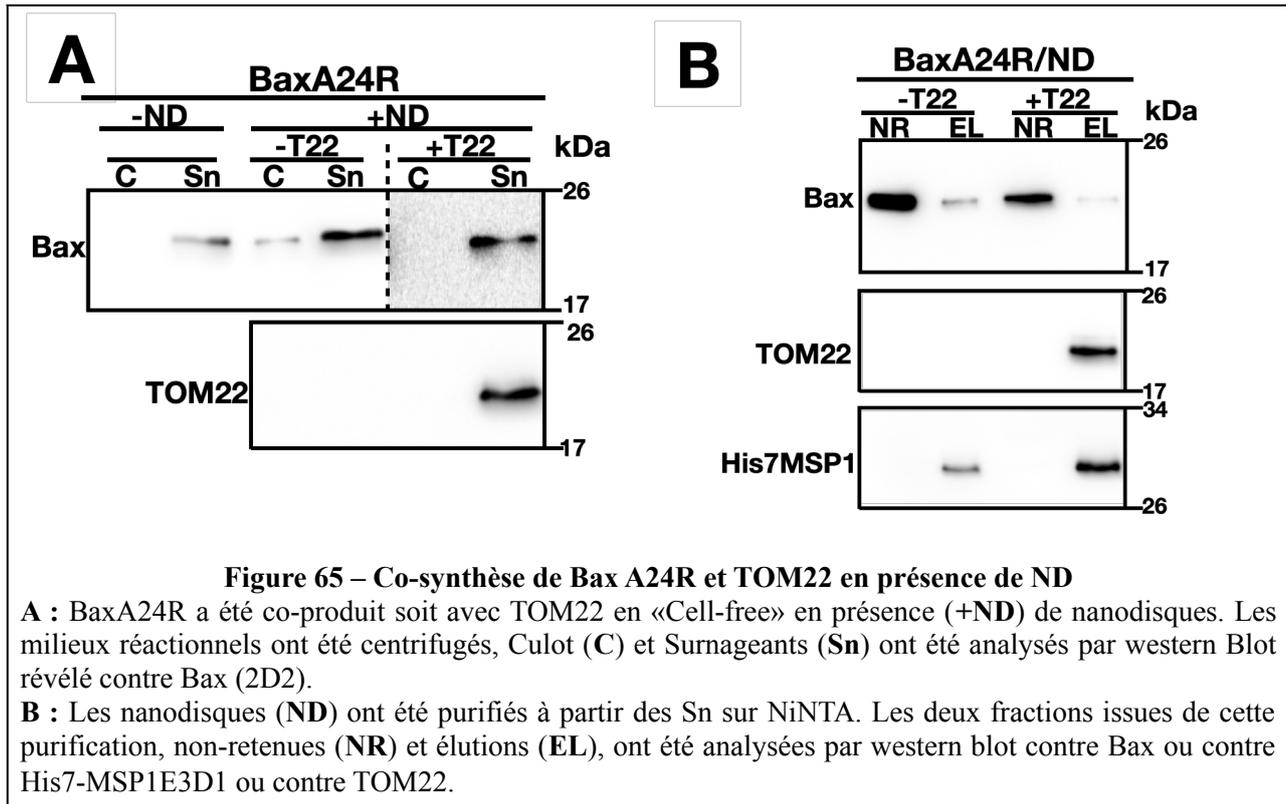
Les analyses du “docking” nous ont suggéré des résidus de Bax potentiellement impliqués dans l’interaction Bax/TOM22. Nous avons réalisé des mutations de ces résidus. Deux d’entre eux ont donné des phénotypes d’intérêt dans notre système *in vitro* :

- 1) La sérine 16 (S16) de l’ART, qui semble directement impliquée dans l’interaction entre Bax et TOM22
- 2) L’aspartate 154 (D154) qui semble impliqué dans le changement conformationnel induit par TOM22 menant à l’insertion de l’hélice $\alpha 9$.

7.5. La mutation de l’alanine 24 (A24) du domaine «GALLL» de l’hélice $\alpha 1$ abroge l’interaction Bax/TOM22

Afin de déterminer les zones de Bax impliquées dans son interaction avec TOM22, Bellot et al (2007) ont réalisé un peptide mapping. Les signaux positifs étaient centrés sur deux peptides : "LCTKVPPEL" (résidus 125-132) situé dans la boucle entre les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$, et "KTGALLLQ" (résidus 21-29) situé dans l'hélice $\alpha 1$ [143]. Ce dernier inclue le domaine "GALLL" que nous avons précédemment décrit comme étant responsable de la précipitation de Bax induite par les nanodisques. La mutation de deux résidus hydrophobes de ce domaine a permis la prévention de la précipitation de Bax (Bax A24R et Bax L26Q). De façon intéressante, Cartron et al ont montré que la mutation A24R permet de limiter l’adressage de Bax à la mitochondrie [142].

Nous avons donc analysé l'effet de la mutation A24R sur l'insertion de Bax induite par TOM22 dans notre système *in vitro*.



Comme nous l'avons précédemment observé (**fig 37B et C**), et contrairement à Bax WT, Bax A24R ne précipite pas en présence de nanodisques mais ne s'y insère pas spontanément (**fig 65A et B**). De façon intéressante, TOM22 ne stimule pas son insertion dans les nanodisques (**fig 65B**). Ceci montre que l'alanine 24 (A24) joue un rôle important dans l'interaction Bax/TOM22 et confirme que l'interaction entre Bax et TOM22 est dépendante de l'exposition du domaine "GALLL" de l'hélice $\alpha 1$. De plus, cette observation est cohérente avec les données de Cartron et al obtenues *in cellulo* suggérant qu'un premier changement conformationnel de Bax est requis pour initier son interaction avec TOM22 [142].

8. L'activation de Bax par TOM22 a-t-elle une pertinence pathophysiologique?

Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre les défauts du processus de l'apoptose et la tumorigenèse [244] [87] (pour revues). De ce fait, plusieurs mécanismes sont développés par les cellules cancéreuses pour échapper à l'apoptose. La diminution de la capacité de Bax à perméabiliser la MOM pourrait être une stratégie limitant l'apoptose dans certains cancers. Dans la base de données COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), il existe des mutations somatiques

dans des cellules cancéreuses dont certaines affectent très certainement la fonction de Bax, par exemple la mutation T174P que nous avons décrite plus haut.

Nos données mettent en lumière un rôle crucial de TOM22 dans l'acquisition d'une conformation active de Bax. On peut alors envisager que des mutations de TOM22 dans les cancers affectent spécifiquement cette activité. TOM22 fait partie du complexe TOM, complexe d'import des protéines mitochondriales, il est donc courant de trouver des mutations de TOM22 affectant son activité d'import. Ainsi, une mutation de TOM22 visant à échapper à l'apoptose devrait conserver son activité d'import de protéines mitochondriale, mais abroger son activité d'activation de Bax.

Le catalogue COSMIC répertorie une dizaine de mutations somatiques dans la partie cytosolique de TOM22 dans les cancers.

Nous avons co-synthétisé les mutants les plus fréquemment trouvés avec Bax^{WT} en présence de nanodisques afin d'analyser leur capacité à promouvoir l'insertion de Bax.

En fonction de leur comportement vis-à-vis de Bax^{WT}, nous avons classé ces mutants en trois catégories :

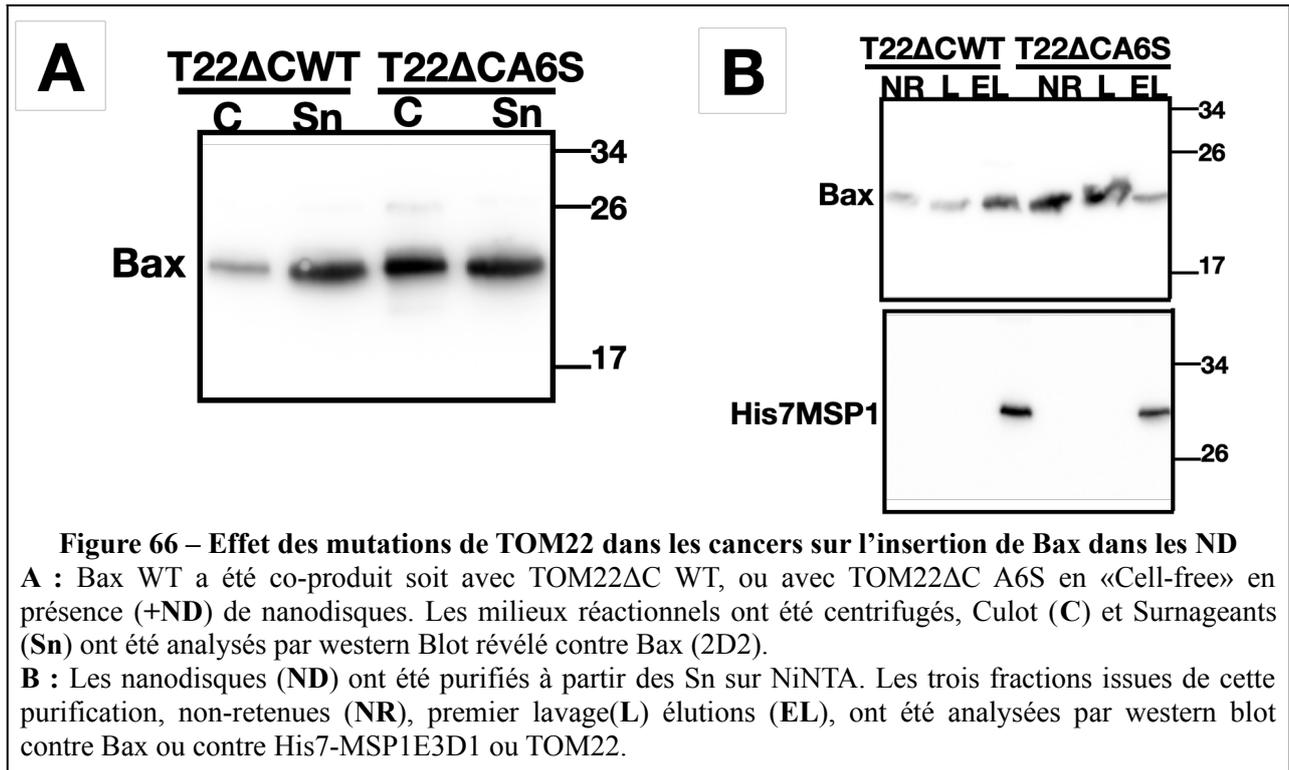
(i) les mutants à effet direct , cette catégorie regroupe les mutants ayant perdu la capacité à interagir avec Bax. Contrairement à TOM22^{WT}, ces mutants ne préviennent pas la précipitation de Bax et ne stimulent pas son insertion dans les nanodisques.

(ii) les mutants à effet indirect, dans cette catégorie, les mutants ont conservé leur capacité à interagir avec Bax (absence de précipitation), mais ont perdu la capacité à induire le changement conformationnel conduisant à l'insertion de Bax.

(iii) les mutants sans effet, ces mutants se comportent comme TOM22^{WT} vis-à-vis de Bax.

8.1. Les mutants à effet direct

La mutation de l'alanine 6 (A6) en sérine (A6S) est une des mutations de TOM22 les plus fréquemment trouvées dans les cancers (carcinome pulmonaire à petites cellules, cancer néoplasique du foie,...).



Nous avons observé que, contrairement à TOM22ΔC WT, TOM22ΔC A6S perd la capacité à prévenir la précipitation de Bax et à promouvoir son insertion dans les nanodisques (**fig 66A et B**). Un résultat similaire est observé avec la version non tronquée de TOM22 A6S, mais la perte d’activité est un peu atténuée comparé à la version tronquée.

Un autre mutant identifié dans des cellules cancéreuse, TOM22 E33G ne présente pas de différence par rapport à TOM22 WT. Néanmoins, en substituant ce résidu par une lysine, nous avons obtenue un mutant E33K qui se comporte comme le mutant A6S (résultat non montré).

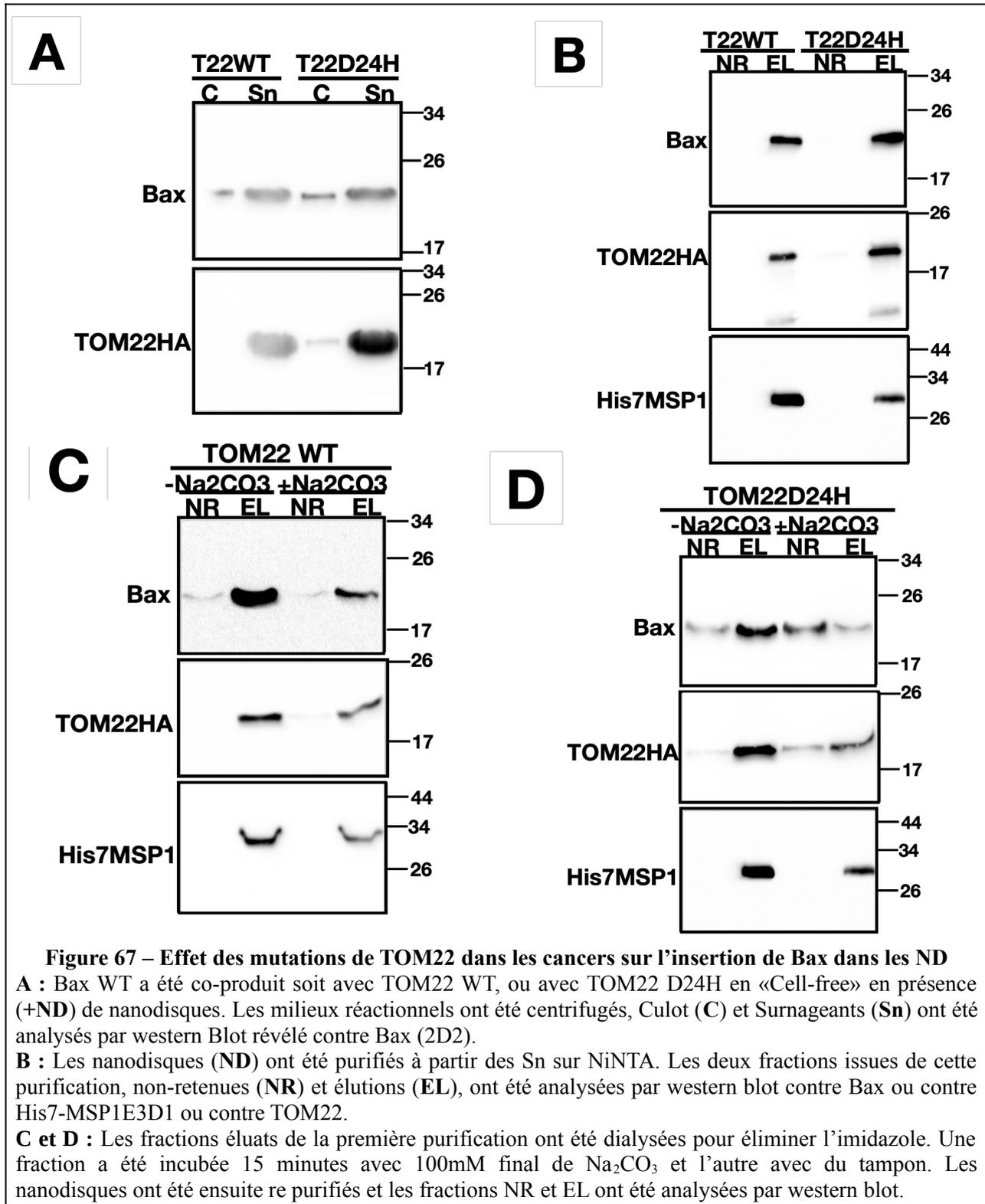
8.2. Les mutants à effet indirect

Des mutations de l’aspartate 24 (D24) sont trouvés dans différents cancers : D24H dans des carcinomes pulmonaires et D24N dans des leucémies aiguës. Nous avons testé la mutation D24H.

Nous avons observé que ce mutant conserve la capacité à prévenir la précipitation de Bax et à stimuler son association avec les nanodisques, suggérant que la mutation n’affecte pas l’interaction entre Bax et TOM22 (**fig 67A et B**).

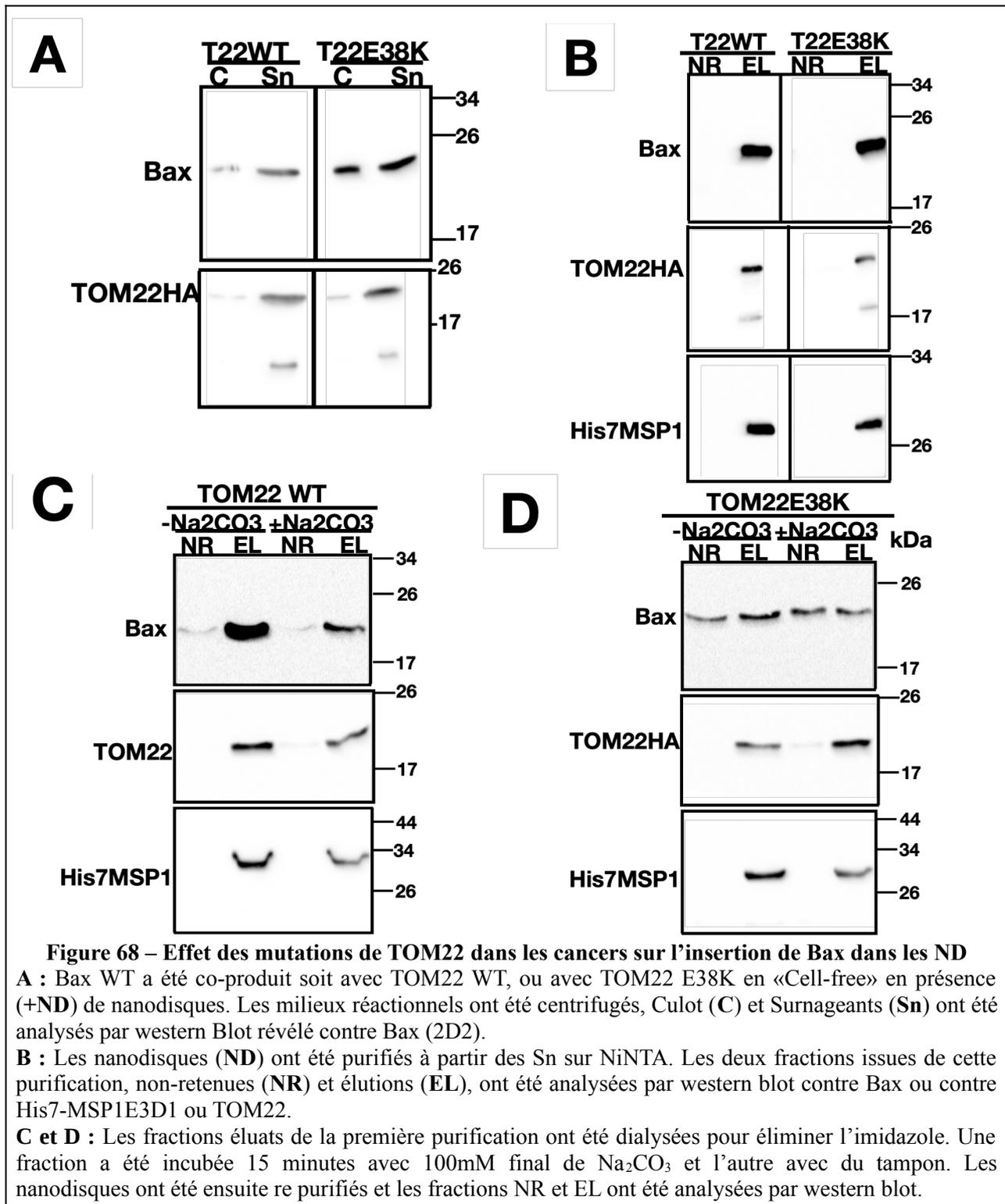
Cependant, en soumettant ces nanodisques au traitement au carbonate de sodium, nous avons observé que TOM22 D24H ne permet pas l’insertion de Bax contrairement à TOM22 WT (**fig 67C**

et D). Ceci suggère que la mutation D24H affecte le changement conformationnel permettant l'insertion de Bax.



8.3. Les mutants sans effet

La mutation du glutamate 38 (E3) en lysine (E38K) est retrouvée dans des adénocarcinomes pulmonaires.



Nous avons observé que ce mutant n'affecte pas significativement l'effet de TOM22 sur la précipitation de Bax et son insertion dans les nanodisques (**fig 68**).

Cette absence d'effet a également été observée pour d'autres mutants identifiés dans les cellules cancéreuses, Q75H, P28S, E33G, F92L (résultat non montré).

Si ces mutations ont vraiment un rôle dans le cancer, il n'est probablement pas lié à l'activation de Bax par TOM22, mais pourrait être lié à l'altération de l'import de certaines protéines mitochondriales. En effet, on sait que l'altération de la fonction bioénergétique mitochondriale est fréquente dans les cellules cancéreuses et que des défauts d'import peuvent y contribuer [245] [246] (pour revues).

9. Discussion du chapitre II

Outre les domaines d'homologies BH, les protéines de la famille de Bcl-2 partagent également une homologie structurale [93] [247]. Kaufmann et al ont montré que l'hélice C-terminale des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Bcl-2 était nécessaire et suffisante pour les cibler et les insérer dans la MOM grâce à un motif nommé "X domain" [103]. À l'inverse, l'hélice $\alpha 9$ de Bax ne possède pas ce motif, et n'est donc pas suffisante pour l'adresser à la MOM [235]. Dans le but de déterminer comment Bax cible spécifiquement la MOM, Cartron et al ont généré des mutations dans la protéine. Seules les mutations A24R et L26V de l'hélice $\alpha 1$ affectent la capacité de Bax à interagir avec la mitochondrie. La suppression de cette hélice suffit à empêcher l'adressage mitochondrial de Bax Ψ (un variant de Bax dépourvu d'ART, constitutivement mitochondrial *in cellulo*) [142]. Ces résultats ont mis en évidence l'existence d'un signal fonctionnel d'adressage de Bax à la MOM dans son hélice $\alpha 1$. De plus, une protéine chimérique contenant l'hélice $\alpha 1$ de Bax fusionnée à la RFP est adressée à la mitochondrie, et inhibe l'interaction de Bax Ψ avec la mitochondrie. Ceci suggère l'implication possible d'un récepteur mitochondrial pour le signal d'adressage porté par l'hélice $\alpha 1$ de Bax [248].

Nous avons mis en évidence que, lorsque Bax interagit avec la bicouche lipidique, la mobilité de son ART est réduite (voir chapitre I). Ce domaine peut alors se stabiliser dans deux conformations distinctes. L'une de ces conformations provoque l'exposition du domaine "GALLL" de l'hélice $\alpha 1$ (dont font partie A24 et L26) ce qui entraîne la précipitation de la protéine. Le changement conformationnel induit par la bicouche lipidique, conduit donc à l'exposition du domaine responsable de l'adressage de Bax vers la MOM *in cellulo*. Cependant, ceci reste insuffisant pour stimuler son insertion dans les nanodisques. Cette observation soutient donc l'hypothèse de Cartron

et al, concernant l'existence d'un récepteur mitochondrial potentiel pour le signal d'adressage présent dans l'hélice $\alpha 1$ de Bax.

Bellot et al ont identifié la sous-unité TOM22 comme étant le récepteur mitochondrial de ce signal. Leurs analyses de «peptide mapping» ont suggéré que l'hélice $\alpha 1$ et la boucle entre les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ étaient les domaines de Bax impliqués dans son interaction avec TOM22.

Les signaux positifs étaient centrés sur deux peptides : "LCTKVPPEL" (résidus 125-132) situé dans la boucle entre les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$, et "KTGALLLQ" (résidus 21-29) situé dans l'hélice $\alpha 1$ [143].

De façon intéressante, le domaine "GALLL" que nous avons identifié comme étant responsable de la précipitation de Bax est donc présent dans son domaine d'interaction avec la sous-unité TOM22. Nous avons observé que TOM22 prévient la précipitation de Bax induite par l'exposition du domaine «GALLL» de l'hélice $\alpha 1$, ce qui est cohérent avec le fait que l'hélice $\alpha 1$ interagisse physiquement avec TOM22 [143].

Le domaine «GALLL» de l'hélice $\alpha 1$ est masqué par l'ART dans la conformation soluble de Bax et l'interaction de Bax avec la bicouche entraîne son exposition. Cette exposition rend l'interaction avec TOM22 possible comme le montre l'abrogation des effets de TOM22 par la mutation de l'alanine 24 (A24) en arginine (A24R) dans le domaine «GALLL». Prises, ensemble, ces données montrent qu'un changement conformationnel de Bax est requis pour initier l'interaction Bax/TOM22. Ceci est cohérent avec l'observation de Bellot et al montrant que cette interaction n'est détectée qu'en conditions apoptotiques [143]. *In cellulo*, ce premier changement conformationnel est attribué aux protéines à BH3 seulement activatrices [181], [228], [249]. Ces observations suggèrent donc que l'acquisition d'une conformation active de Bax nécessite une coopération entre les protéines à BH3 seulement activatrices et TOM22. On peut alors se demander comment les changements conformationnels induits par TOM22 sont liés à ceux induits par les protéines à BH3 seulement activatrices.

Dans notre système, nous avons montré que les activateurs directs de Bax ne stimulent pas son insertion dans les nanodisques. À l'inverse, nous avons montré que la présence de TOM22 est nécessaire et suffisante pour stimuler l'insertion de Bax.

Il a été montré que les protéines à BH3 seulement possèdent deux sites de fixation distincts sur Bax (**fig 21 et 22 cf introduction**) :

(i) le site «canonique», plutôt spécifique de BidBH3, dont la fixation conduit à l'extrusion du domaine BH3 de Bax (hélice $\alpha 2$) conduisant ainsi à la dimérisation de la protéine [179].

(ii) le site «non-canonique», plutôt spécifique de BimBH3, dont la fixation entraîne une suite progressive de changements conformationnels pouvant conduire à la libération de l'hélice $\alpha 9$ et donc à l'insertion de Bax [154].

On peut cependant noter que les expériences rapportées par Czabotar et al sur l'effet de BidBH3 ont été réalisées sur une version de Bax dépourvue de l'hélice $\alpha 9$; un effet potentiel sur la conformation de l'hélice $\alpha 9$ n'était donc pas détectable dans ces expériences.

Nous avons montré que, suite au changement conformationnel induit par l'interaction Bax/TOM22, les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 9$ de Bax sont insérées dans la bicouche lipidique (**fig 52B et C**), ce qui est cohérent avec la conformation de Bax insérée connue dans la littérature [192], [241].

Les données structurales obtenues par Suzuki et al ont montré que la stabilité de l'hélice $\alpha 9$ est fortement renforcée par la présence de plusieurs résidus hydrophiles dans cet hélice (**fig 19C**). De façon cohérente, nos données montrent que les changements conformationnels induits par la bicouche lipidique ne modifient pas la conformation de l'hélice $\alpha 9$ (**fig 55**). Ainsi, au moment de son interaction avec TOM22, l'hélice $\alpha 9$ de Bax est encore localisée dans le sillon hydrophobe. A l'issue de cette interaction, l'hélice $\alpha 9$ est insérée dans la bicouche. De plus, la délétion de l'hélice $\alpha 9$ est suffisante pour empêcher l'insertion de Bax dans la bicouche lipidique induite par TOM22. L'ensemble de ces données montre que l'aboutissement du changement conformationnel de Bax induit par TOM22 est le délogement de l'hélice $\alpha 9$ du sillon hydrophobe et la promotion de son insertion dans la bicouche. L'insertion de cette hélice est la première étape menant à l'insertion de la protéine.

Cette hélice est normalement plus exposée dans le mutant Bax P168A comparé à la protéine sauvage ce qui conduit à une localisation mitochondriale constitutive de ce mutant *in cellulo* [164] [155]. Nous avons observé que l'insertion du mutant Bax P168A dans les nanodisques est aussi dépendante de TOM22 que celle de Bax WT. On peut alors émettre l'hypothèse qu'en plus de déloger l'hélice $\alpha 9$, TOM22 participe à son positionnement dans une conformation propice à son insertion. Cette hypothèse est en accord avec celle de Cartron et al 2008, stipulant que le complexe TOM est impliqué non seulement dans le recrutement de Bax à la MOM mais également dans l'acquisition d'une conformation propice à l'oligomérisation dans la MOM.

Nous avons observé que, bien qu'ils induisent un mouvement de l'hélice $\alpha 9$ [154], BimBH3 et BTSA1 sont inefficaces pour promouvoir l'insertion de Bax dans les nanodisques. Ceci pourrait donc s'expliquer par l'absence de TOM22 qui empêcherait un positionnement adéquat de l'hélice $\alpha 9$.

Ceci met en lumière le rôle primordial de TOM22 dans l'acquisition d'une conformation de Bax propice à l'insertion. On peut d'ailleurs noter que l'insertion de Bax Ψ , qui est indépendante des protéines à BH3 seulement activatrices, reste strictement dépendante de TOM22 [248].

La difficulté à détecter l'interaction Bax/TOM22 par immunoprécipitation et le fait que TOM22 Δ C soit aussi efficace que TOM22 membranaire, suggèrent que cette interaction est un processus transitoire de type "touch and run".

Nous avons montré que la mutation de l'alanine 24 (A24) du domaine «GALLL» en arginine (A24R) était suffisante pour rompre l'interaction Bax/TOM22 montrant que ce résidu est directement impliqué dans cette interaction.

Cependant, les données issues du «docking» Bax/TOM22 ont suggéré l'implication de trois autres résidus de Bax dans la stabilité de cette interaction.

Tout comme la mutation A24R, la mutation de la sérine 16 (S16) de l'ART en alanine (S16A) a permis d'abroger l'interaction Bax/TOM22 et d'empêcher ainsi le changement conformationnel permettant son insertion. Cette observation met en évidence un rôle important de l'ART dans l'interaction Bax/TOM22. Cependant, Bax Ψ dépourvue de l'ART (et donc du S16) est également dépendant de TOM22 pour être relocalisé vers la MOM [248].

Il est possible que la mutation S16A confère à l'ART une conformation déstabilisant l'interaction entre l'hélice α 1 et TOM22. Ceci est cohérent avec le rôle régulateur de l'ART dans la relocalisation mitochondriale de Bax [150].

Ainsi, l'ART et l'hélice α 1 jouent probablement des rôles distincts dans l'interaction Bax/TOM22.

D'autre part, Arokium et al ont montré que l'arginine 9 (R9) peut établir une liaison ionique avec l'aspartate 154 (D154) dans l'hélice α 7 favorisant ainsi une conformation relativement stable de l'ART (position fermée) [157]. La rupture de cette liaison par inversion de charge, R9E ou D154K, est suffisante pour relocaliser Bax de façon constitutive à la MOM dans la levure. Ceci montre un rôle important de la conformation de l'ART dans l'adressage de Bax vers la MOM.

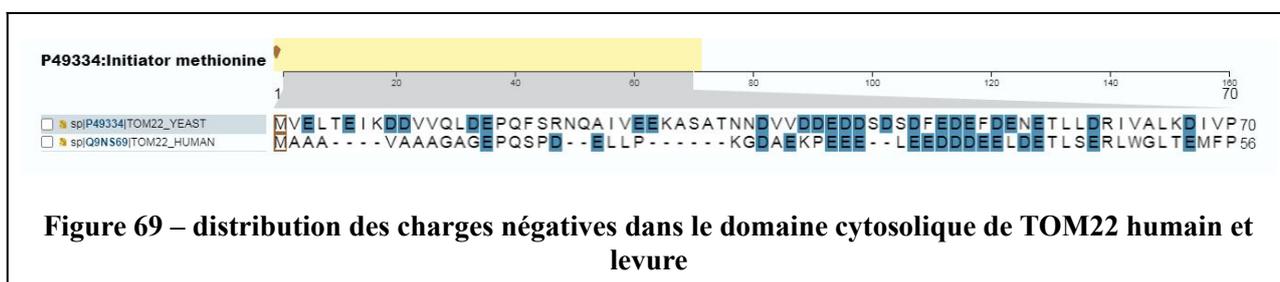
De façon intéressante, nous avons observé que le mutant R9E récapitule la conformation de Bax induite par TOM22. Ce mutant Bax R9E est constitutivement inséré dans les nanodisques indépendamment de TOM22. Ceci montre qu'une conformation adéquate de l'ART (conférée par la mutation R9E) est suffisante pour l'adressage et l'insertion de Bax dans les nanodisques.

A l'inverse, le mutant D154K n'est pas constitutivement inséré dans les nanodisques et perd la capacité à subir le changement conformationnel induit par TOM22 nécessaire à son insertion.

Néanmoins, la mutation de ce résidu en tyrosine (Y) rétablit l'interaction mais pas l'insertion. Ceci montre que ce résidu participe au changement conformationnel de Bax induit par TOM22.

La protéine TOM22 étant riche en résidus chargés négativement, on peut envisager que la charge négative du D154 de Bax participe à déstabiliser cette interaction par répulsion. L'inversion de cette charge dans le mutant D154K pourrait alors créer des interactions non pertinentes.

Nos expériences ont été réalisées avec TOM22 humain alors que celles d'Arokium et al ont été réalisées dans la levure. La répartition des charges négatives dans TOM22 humaine et fongique étant différente (**fig 69**), on peut alors envisager que des interactions non pertinentes se soient créées avec TOM22 de levure.



L'implication de TOM22 dans l'acquisition d'une conformation active de Bax semble avoir une pertinence physiopathologique. En effet, certaines mutations somatiques de TOM22 trouvées dans les cancers entraînent la perte de la capacité à interagir avec Bax ou de la capacité à induire le changement conformationnel conduisant à l'insertion de Bax.

La partie cytosolique de la sous-unité TOM22 est riche en charges négatives impliquées dans sa fonction de récepteur des préséquences d'adressage mitochondrial qui sont chargées positivement. A l'inverse, l'interaction de Bax avec TOM22 semble être de nature hydrophobe. En effet, parmi les domaines d'interactions mis en évidence par le «peptide mapping», la mutation de l'alanine A24 en arginine (A24R) au sein du domaine «GALLL» de l'hélice α 1 est suffisante pour abroger l'interaction Bax/TOM22. De même, parmi les mutations de TOM22 (trouvés dans les cancers) la mutation de l'alanine 6 (A6) en sérine (TOM22 A6S) est suffisante pour abroger l'interaction TOM22/Bax. Prises ensemble, ces données suggèrent que l'interaction entre Bax et TOM22 est de nature hydrophobe et est donc d'une nature différente de celle mise en œuvre pour sa fonction de récepteur des préséquences d'adressage mitochondriale.

Il semble néanmoins que la présence de charges négatives soit importante pour induire le changement conformationnel. En effet, TOM22 prévient la précipitation du mutant D154Y mais ne stimule pas son insertion dans les nanodisques. Ceci montre que le résidu D154 dans l'hélice α 7 n'est pas directement impliqué dans l'interaction avec TOM22 mais est plutôt impliqué dans le

changement conformationnel subséquent. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les peptides contenant le résidu D154 ne génèrent aucun signal dans l'expérience de «peptide mapping» [143]. De façon intéressante, parmi les mutants de TOM22 trouvés dans les cancers, seule la mutation de l'aspartate 24 (D24) en histidine (TOM22 D24H) donne le même phénotype que la mutation du D154Y de Bax. On peut supposer que des charges négatives présentes sur les deux protéines soient impliquées dans le changement conformationnel conduisant à l'activation de Bax.

III. Bax et Bcl-xL s'insèrent dans les nanodisques sous-forme d'hétérodimère inactif

1. Contexte

Les observations en microscopie confocale sur la localisation subcellulaire des protéines de la famille de Bcl-2 ont montré que Bcl-2 et Bcl-xL étaient toutes deux localisées dans la MOM en conditions physiologiques comme en situation apoptotique [250], [251]. *A contrario*, la protéine Bax est initialement cytosolique et est relocalisée dans la MOM suite à l'induction de l'apoptose [116]. Ces résultats suggéraient une localisation exclusivement cytosolique de Bax dans les cellules en conditions physiologiques. Néanmoins, il a été montré plus tard que la localisation subcellulaire de Bax en conditions physiologiques suivait un équilibre dynamique entre au moins deux compartiments, le cytosol et la MOM [167]. Cet échange dynamique semble être stimulé par la protéine anti-apoptotique Bcl-xL. En effet, plusieurs études ont mis en évidence le fait que Bcl-xL soit capable d'effectuer une rétrotranslocation de Bax depuis la MOM vers le cytosol de façon dépendante de son extrémité C-terminale [109], [110]. Edlich et al (2011) ont d'ailleurs proposé ce processus comme étant la principale voie d'inhibition de la perméabilisation de la MOM dépendante de Bax par les membres anti-apoptotiques tels que Bcl-xL [109]. Ainsi, l'existence de ce phénomène de rétrotranslocation suggère qu'en conditions physiologiques, lorsque Bcl-xL est présente, Bax a une localisation majoritairement cytosolique. *A contrario*, lorsque Bcl-xL est absente, Bax est partagée entre les deux compartiments. Ceci est plutôt cohérent avec les précédentes observations de Gardai et al (2004) [159] qui soutiennent que la phosphorylation de Bax au niveau de la sérine 184 (S184) favorise son hétérodimérisation avec les membres anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-xL [167]. Cette hétérodimère maintiendrait la protéine dans le cytosol, empêchant ainsi la perméabilisation de la MOM médiée par Bax.

Cependant, cette hypothèse de séquestration de Bax hors de la MOM par Bcl-xL et les autres protéines anti-apoptotiques ne fait pas l'unanimité. En effet, dans des cellules qui surexpriment les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Bcl-2, la quantité mitochondriale de Bax augmente de façon considérable [252] [108]. Cette augmentation est telle que le niveau mitochondrial de Bax dans ces cellules est comparable à celui mesuré dans les cellules en apoptose. Si cette observation paraît contradictoire avec la fonction supposée anti-apoptotique de ces protéines, elle suggère néanmoins une implication des membres anti-apoptotiques dans la translocation de Bax vers la MOM.

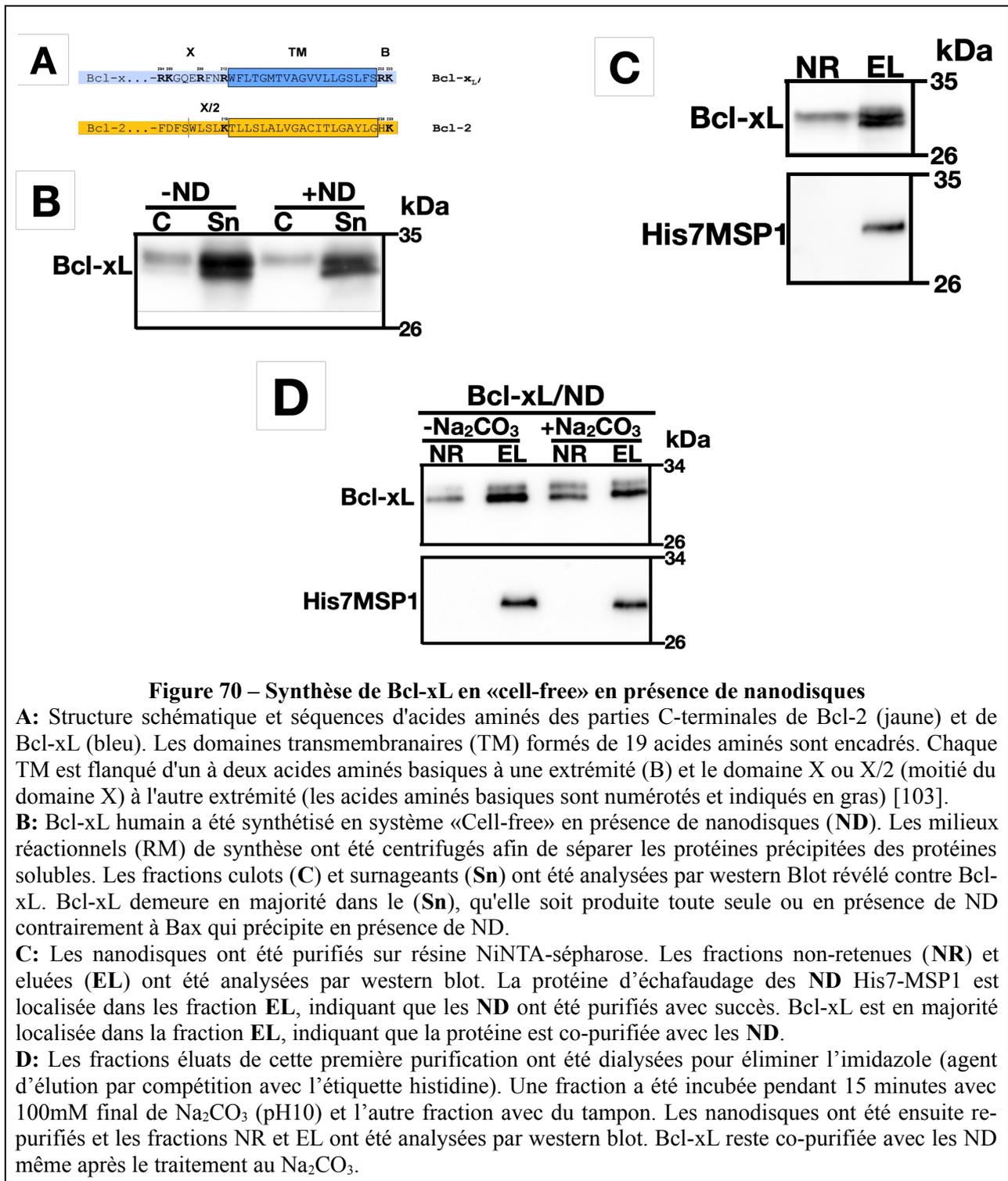
L'augmentation de la translocation de Bax du cytosol vers la mitochondrie est un événement central dans la perméabilisation de la MOM.

Dans la continuité de notre travail visant à identifier les partenaires de Bax et les mécanismes par lesquels ces derniers favorisent sa translocation et son insertion dans un environnement membranaire, nous avons investigué dans notre système *in vitro* le rôle potentiel de Bcl-xL dans ces processus.

2. Bcl-xL est spontanément insérée dans les nanodisques

Pour investiguer comment la translocation de Bax dans un environnement membranaire est régulée par Bcl-xL nous avons dans un premier temps analysé le comportement de Bcl-xL dans notre système *in vitro*. *In cellulo*, Bcl-xL a majoritairement une localisation mitochondriale. Cette localisation est soutenue par la présence d'une séquence de résidus nommés «X domain» [103]. La particularité de ce motif localisé à l'extrémité C-terminale, est la présence en amont de la région transmembranaire d'un domaine riche en acides aminés chargés positivement (**fig 70 A**). La mutation de ces charges positives en alanine abroge la localisation mitochondriale de Bcl-xL. Ce motif permet donc de cibler Bcl-xL à la MOM *via* l'insertion de son hélice α C-terminale. On pourrait donc s'attendre à ce que Bcl-xL soit spontanément inséré dans les nanodisques.

Pour tester cette hypothèse, Bcl-xL «full length» a été synthétisée dans le système «Cell-free» en présence de nanodisques.



Nous avons observé que, contrairement à Bax, Bcl-xL reste dans la fraction soluble lorsqu'elle est synthétisée en présence de nanodisques (**fig 70B**). De plus, elle est majoritairement co-purifiée avec les nanodisques (**fig 70C**). Cette fraction co-purifiée est résistante au traitement au carbonate de sodium (**fig 70D**). Ceci montre que Bcl-xL s'insère spontanément dans les nanodisques contrairement à Bax, ce qui est cohérent avec le comportement de Bcl-xL *in cellulo* [103].

L'expression hétérologue et la purification des protéines de la famille de Bcl-2 dans la bactérie *E.coli* sont des processus assez complexes en raison de leurs hélices α C-terminales faisant office d'ancre membranaire. Ces difficultés d'expression ont longtemps contraint les chercheurs à travailler avec des mutants dépourvus des hélices C-terminales.

Dans le cas de Bcl-xL, pendant longtemps, la protéine recombinante a été produite sous forme de protéine soluble dans *E. coli* et a été considérée comme étant la version «Full length». Cependant, en 2015, Yao et al ont démontré que la fraction soluble de Bcl-xL était clivée entre les résidus 218 et 219, éliminant ainsi une grande partie de l'hélice C-terminale, alors que la protéine «Full length» était présente dans les corps d'inclusion [253]. De façon étonnante, la protéine tronquée en C-terminal (218 résidus) présente le même profil de migration en SDS PAGE Tris/glycine que la protéine «Full length». Ceci explique probablement pourquoi les chercheurs avaient considéré cette protéine comme étant «Full length».

Le système de synthèse «Cell-free» consiste à extraire des cellules la machinerie nécessaire à la traduction [203]. Cet extrait cellulaire apporte la machinerie ainsi que les co-facteurs nécessaires à la traduction de la protéine à l'extérieur de la cellule. Notre système «cell-free» étant basé sur un extrait de *E. coli*, la protéine Bcl-xL produite dans ce système pourrait être soumise au même clivage que celle produite *in cellulo* dans *E. coli*.

3. L'insertion dans les nanodisques protège Bcl-xL contre la troncation de son hélice α C-terminale

La troncation de l'hélice C-terminale de Bcl-xL supprime 15 résidus dont deux qui sont chargés positivement, l'arginine 230 (R230) et la lysine 231 (K231). La suppression de ces résidus chargés devrait suffisamment modifier le point isoélectrique (pI) pour pouvoir différencier la protéine tronquée (pI théorique de l'ordre de 4,7) de la protéine «Full length» (pI théorique de l'ordre de 4,9) en isofocalisation électrique (IEF). La protéine Bcl-xL produite dans notre système «Cell-free» et insérée dans les nanodisques, et celle produite en absence de nanodisques ont été analysées par IEF et comparées aux protéines produites *in cellulo* dans *E. coli*, et récupérées dans les corps d'inclusion (version full length) ou dans les fractions solubles (version tronquée).

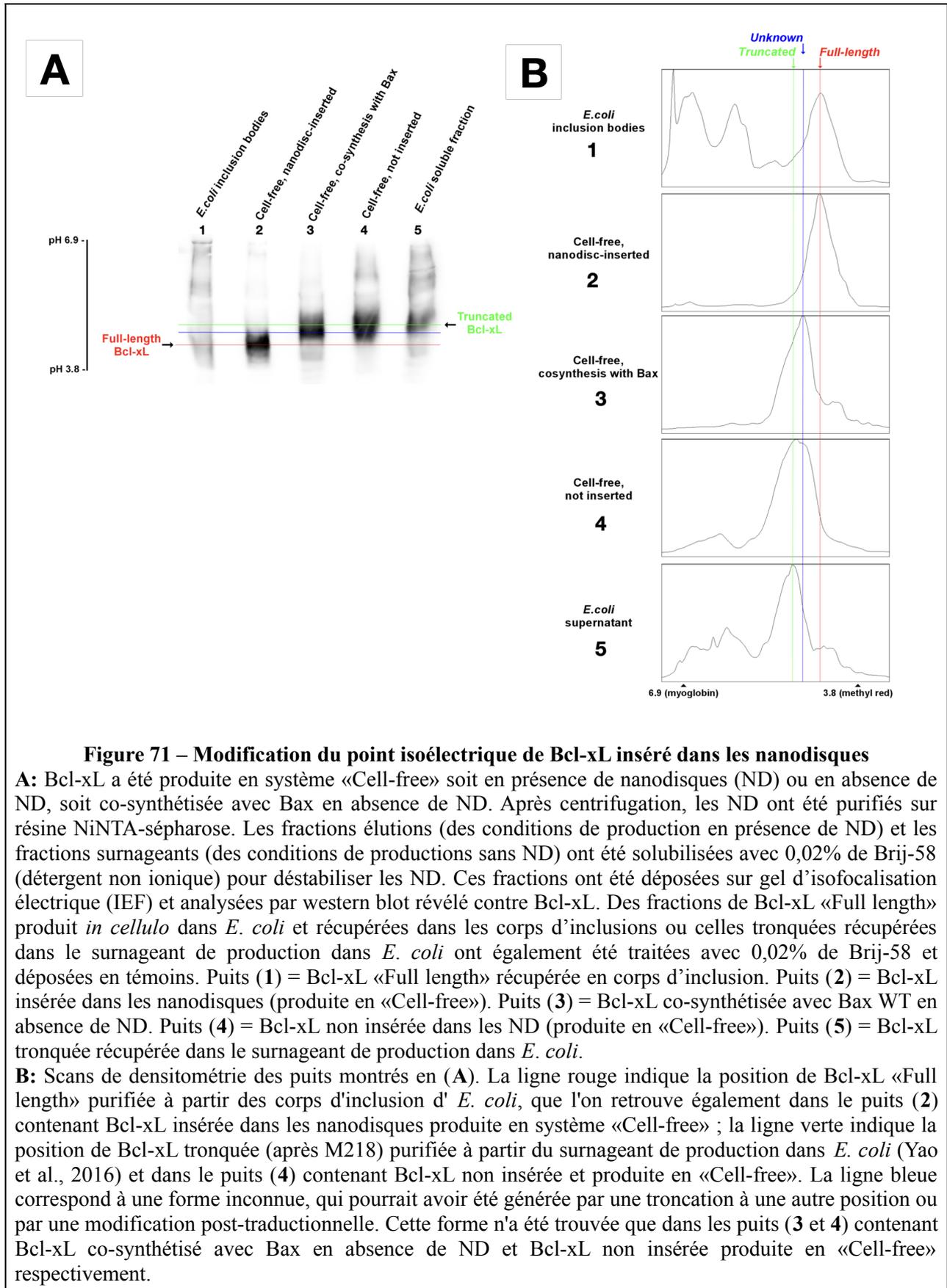


Figure 71 – Modification du point isoélectrique de Bcl-xL inséré dans les nanodisques

A: Bcl-xL a été produite en système «Cell-free» soit en présence de nanodisques (ND) ou en absence de ND, soit co-synthétisée avec Bax en absence de ND. Après centrifugation, les ND ont été purifiés sur résine NiNTA-sépharose. Les fractions éluées (des conditions de production en présence de ND) et les fractions surnageants (des conditions de productions sans ND) ont été solubilisées avec 0,02% de Brij-58 (détergent non ionique) pour déstabiliser les ND. Ces fractions ont été déposées sur gel d'isofocalisation électrique (IEF) et analysées par western blot révéler contre Bcl-xL. Des fractions de Bcl-xL «Full length» produit *in cellulo* dans *E. coli* et récupérées dans les corps d'inclusions ou celles tronquées récupérées dans le surnageant de production dans *E. coli* ont également été traitées avec 0,02% de Brij-58 et déposées en témoins. Puits (1) = Bcl-xL «Full length» récupérée en corps d'inclusion. Puits (2) = Bcl-xL insérée dans les nanodisques (produite en «Cell-free»). Puits (3) = Bcl-xL co-synthétisée avec Bax WT en absence de ND. Puits (4) = Bcl-xL non insérée dans les ND (produite en «Cell-free»). Puits (5) = Bcl-xL tronquée récupérée dans le surnageant de production dans *E. coli*.

B: Scans de densitométrie des puits montrés en (A). La ligne rouge indique la position de Bcl-xL «Full length» purifiée à partir des corps d'inclusion d' *E. coli*, que l'on retrouve également dans le puits (2) contenant Bcl-xL insérée dans les nanodisques produite en système «Cell-free» ; la ligne verte indique la position de Bcl-xL tronquée (après M218) purifiée à partir du surnageant de production dans *E. coli* (Yao et al., 2016) et dans le puits (4) contenant Bcl-xL non insérée et produite en «Cell-free». La ligne bleue correspond à une forme inconnue, qui pourrait avoir été générée par une troncation à une autre position ou par une modification post-traductionnelle. Cette forme n'a été trouvée que dans les puits (3 et 4) contenant Bcl-xL co-synthétisé avec Bax en absence de ND et Bcl-xL non insérée produite en «Cell-free» respectivement.

Nous avons observé que la protéine insérée dans les nanodisques possède le même point isoélectrique que la protéine «Full length» produite *in cellulo* dans *E. coli* et récupérée dans les corps d'inclusion (**fig 71 ligne rouge**). *A contrario*, la protéine Bcl-xL produite en «Cell-free» en absence de nanodisques possède un point isoélectrique similaire à celle récupérée dans les fractions solubles de production dans *E. coli* (version tronquée de la protéine). Ces résultats suggèrent que Bcl-xL insérée dans les nanodisques est «Full length» et que la présence ou l'insertion de Bcl-xL dans les nanodisques prévient le clivage de l'hélice C-terminale.

Nous avons noté la présence d'une troisième forme de Bcl-xL dans la fraction produite en «Cell-free» en absence de nanodisques (**fig 71 ligne bleue**). Cette forme semble posséder un point isoélectrique différent de la forme tronquée décrite par Yao et al 2016. De plus, la co-synthèse de Bcl-xL avec son partenaire Bax en absence de nanodisques ne permet pas de protéger Bcl-xL contre le clivage. Néanmoins, dans cette condition de co-synthèse, de façon surprenante, la forme de clivage prédominante est la nouvelle forme dont le point isoélectrique est différent de la forme tronquée précédemment décrite par Yao et al 2016 (**fig 71 ligne verte**).

4. Bcl-xL inséré dans les nanodisques n'est pas tronquée

Pour confirmer que Bcl-xL en nanodisques est «Full length», nous avons réalisé une analyse MALDI-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Mass Spectrometry). Bcl-xL a été produite en système «cell-free» en présence de nanodisques (**Fig 72A**). Les nanodisques ont été purifiés sur résine Ni-NTA-sépharose, pour obtenir une fraction d'élution exempte de la protéine d'échafaudage des nanodisques (His7-MSP1E3D1), l'élution a été réalisée avec 50mM de détergent (Sodium cholate) afin de solubiliser les nanodisques et récupérer Bcl-xL dans l'éluat (fig 72B).

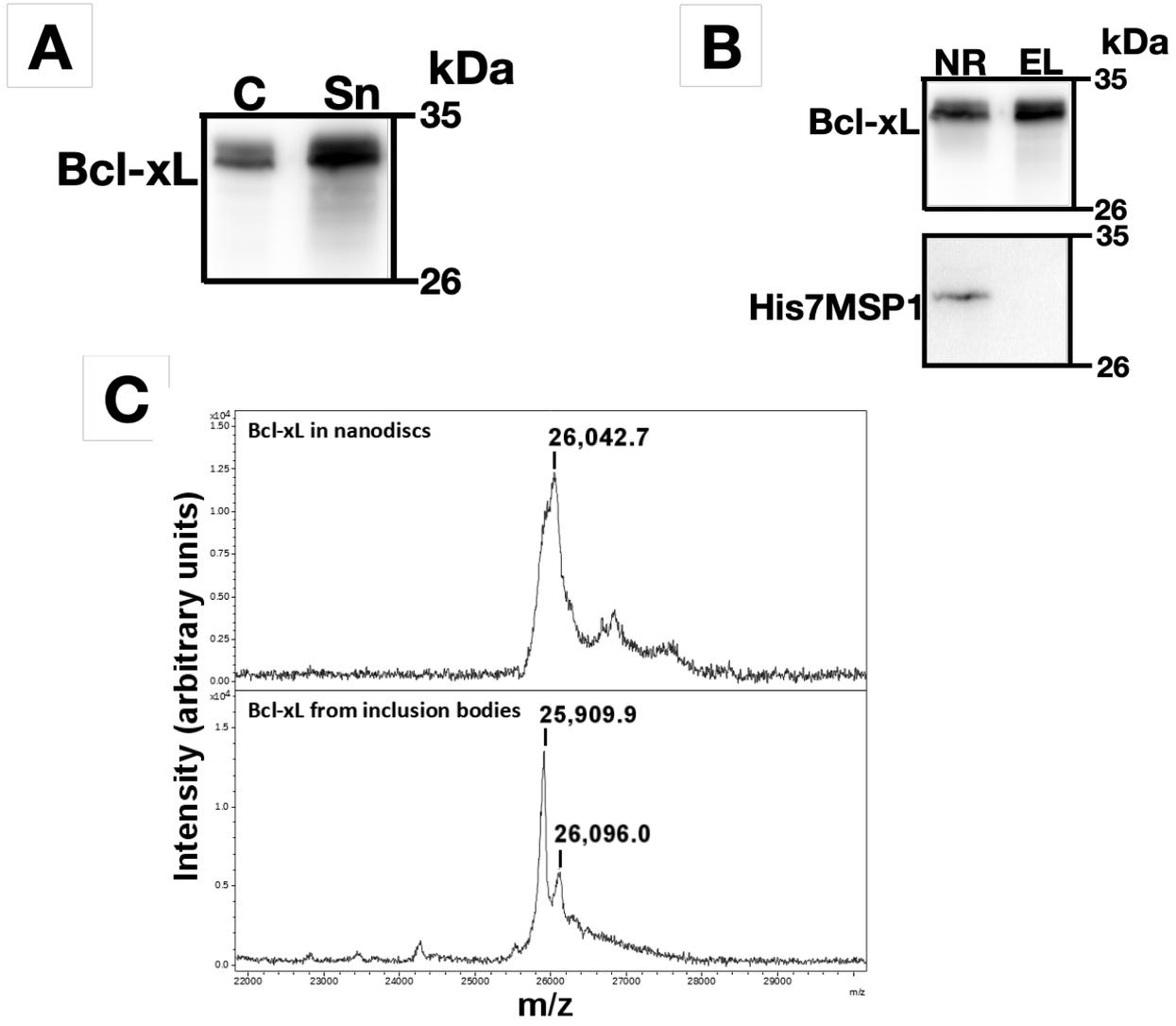


Figure 72 – Analyse MALDI-MS de Bcl-xL insérée dans les nanodisques

A: Bcl-xL a été synthétisée en système «Cell-free» en présence de nanodisques (ND). Les milieux réactionnels (RM) de synthèse ont été centrifugés afin de séparer les protéines précipitées des protéines solubles. Les fractions culots (C) et surnageants (Sn) ont été analysées par western blot révélé contre Bcl-xL.

B: Les nanodisques ont été purifiés sur résine NiNTA. Pour obtenir une fraction d'élution pure en Bcl-xL pour les analyses de MALDI, l'élution a été réalisée avec 50mM de Chololate de sodium afin de solubiliser les ND et maintenir la protéine His7MSP1E3D1 fixée à la résine. La fraction éluat ne contenant que Bcl-xL a été dialysée pour éliminer le Chololate de sodium.

C: Analyse MALDI-MS de la fraction élution (EL) (B). Comparaison de la masse de Bcl-xL pleine longueur purifiée à partir de corps d'inclusion d'*E.coli* (carré bas) à celle de Bcl-xL insérée dans les nanodisques produite en «Cell-free» (carré haut). Ce dernier présente un pic majeur à 26046 Da (± 10 Da) (moyenne de deux mesures individuelles), proche de la masse théorique de Bcl-xL pleine longueur (26049 Da), alors que Bcl-xL purifiée à partir des corps d'inclusion présente deux pics, un à 25906 Da et l'autre à 26095 Da (moyenne de deux mesures individuelles), proches de la masse théorique de Bcl-xL «Full length» privée de la méthionine initiatrice (masse théorique de 25917 Da) et de la protéine «Full length» portant une méthionine acétylée (masse théorique de 26091 Da), respectivement.

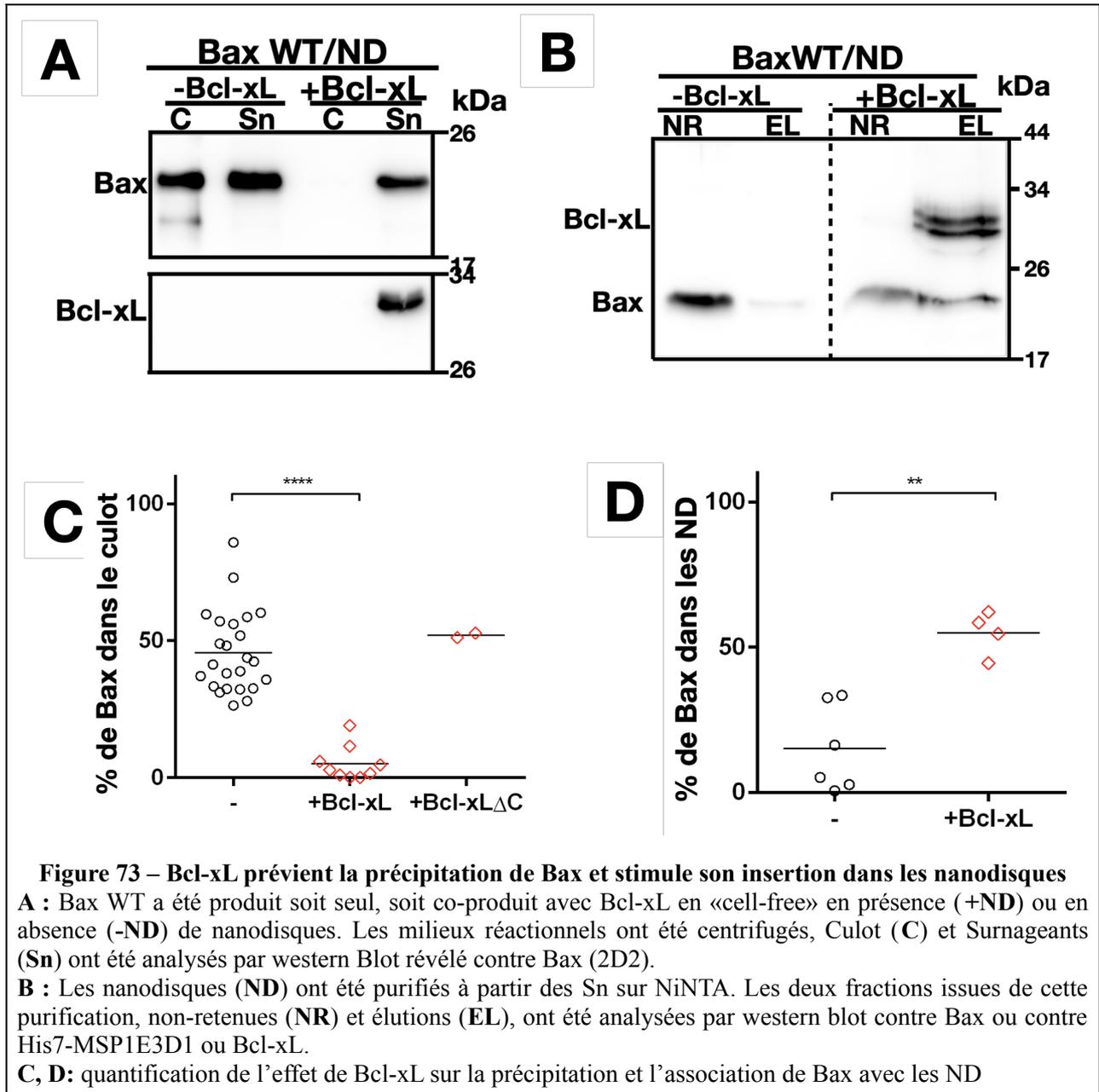
L'analyse MALDI-MS (fig 72C) révèle que la masse de la protéine Bcl-xL produite en «cell-free» et insérée dans les nanodisques, 26046 Da (± 10 Da), est similaire à la masse théorique de la

protéine Bcl-xL «full length» qui est de 26049 Da. En contrôle, nous avons mesuré la masse de Bcl-xL «full length» produite *in cellulo* dans *E. coli*, et récupérée dans les corps d'inclusion. L'analyse a révélé deux pics, un pic majeur dont la masse est de 25906 Da (± 10 Da) et un pic mineur dont la masse est de 26096 (± 10 Da). La différence de masse entre le pic majeur de la protéine produite en bactérie et celle produite en «Cell-free» est de 140 Da, ce qui correspond à la masse de la méthionine initiatrice. Le pic mineur (26096 Da ± 10 Da) pourrait correspondre à la protéine avec sa méthionine initiatrice (26046 Da ± 10 Da) et ayant subi une modification post-traductionnelle telle que l'acétylation (+42 Da). Ces résultats suggèrent que la protéine Bcl-xL produite en «Cell-free» et insérée dans les nanodisques est exempte de la troncation de ses 13 derniers résidus. Ainsi notre système de synthèse «Cell-free» à base d'extrait cellulaire d'*E. coli* reproduit les modifications subies par Bcl-xL lors de sa synthèse dans la Bactérie et sa protection *via* son insertion membranaire.

La fraction de Bcl-xL insérée dans les nanodisques est donc intacte et peut conserver ses capacités potentielles à moduler la localisation membranaire de Bax.

5. Bcl-xL prévient la précipitation de Bax et stimule son insertion dans les nanodisques

Pour investiguer la capacité de Bcl-xL à favoriser la translocation de Bax dans un environnement membranaire, les deux protéines ont été co-synthétisées en «Cell-free» en présence de nanodisques.



Nous avons observé que, comme TOM22, Bcl-xL prévient la précipitation de Bax provoqué par l'exposition de son domaine «GALLL» et stimule sa co-purification avec les nanodisques (**fig 73**).

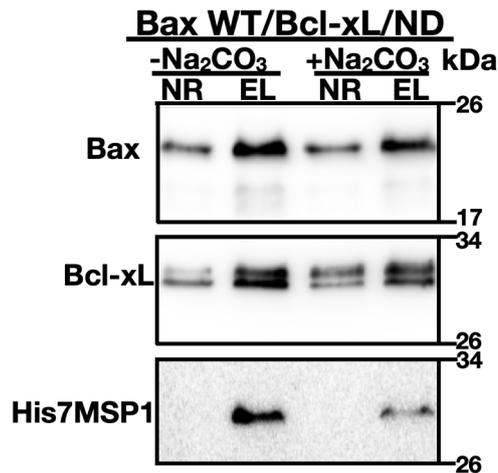


Figure 74 – Traitement au carbonate de sodium des nanodisques contenant Bax et Bcl-xL

Les fractions éluées de cette première purification ont été dialysées pour éliminer l'imidazole (agent d'éluion par compétition avec l'étiquette histidine). Une fraction a été incubée pendant 15 minutes avec 100mM final de Na₂CO₃ et l'autre fraction avec du tampon. Les nanodisques ont été ensuite re purifiés et les fractions NR et EL ont été analysées par western blot. Bcl-xL et Bax reste co-purifiée avec les ND même après le traitement au Na₂CO₃.

De plus, les deux protéines sont résistantes au traitement au carbonate de sodium (**fig 74**). Ceci suggère que Bax et Bcl-xL sont toutes deux insérées dans la bicouche lipidique.

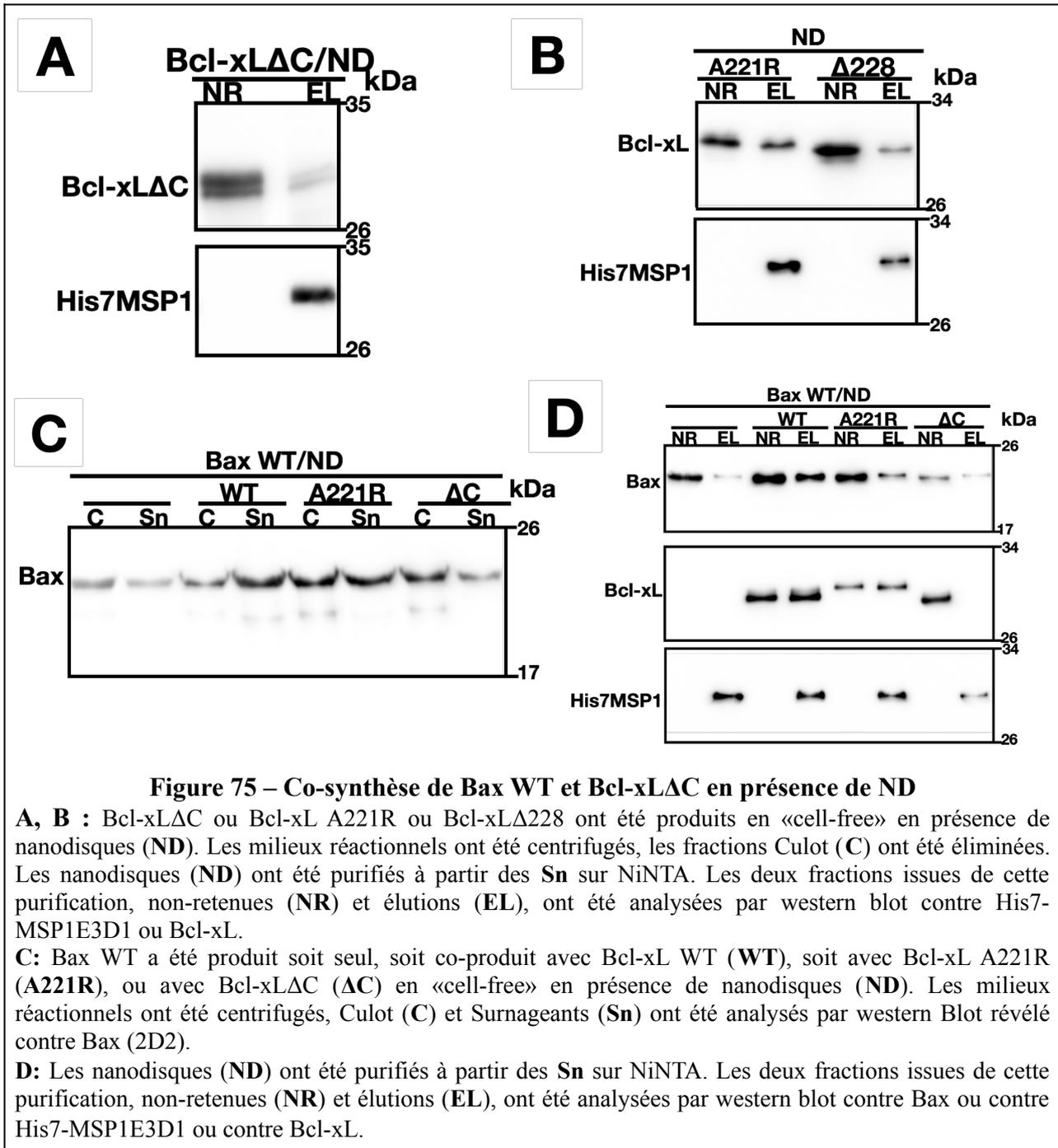
Cette observation suggère que, comme TOM22, Bcl-xL peut induire un changement conformationnel de Bax propice à son insertion dans les nanodisques. Sachant que Bcl-xL est un inhibiteur de Bax, on peut alors se poser la question de savoir quelle est la conformation acquise par Bax dans ces conditions.

6. Bax et Bcl-xL sont co-insérées dans les nanodisques

Nos données ont montré que Bax et Bcl-xL sont insérées dans les nanodisques, suggérant que Bcl-xL induit un changement conformationnel de Bax permettant son insertion. Nous avons précédemment montré que TOM22 induit un changement conformationnel de Bax permettant son insertion. Dans ces conditions, l'insertion de Bax dans les nanodisques ne dépend pas de l'insertion préalable de TOM22, puisque TOM22ΔC est aussi efficace que TOM22 membranaire. On peut donc se poser la question de savoir si le processus par lequel Bcl-xL stimule l'insertion de Bax est le même.

Pour tester cette hypothèse, nous avons généré un variant de Bcl-xL dépourvu de son hélice α C-terminale (son ancre membranaire), Bcl-xLΔC (résidus 1-212). Dans un premier temps, nous avons

observé que le retrait de cette hélice empêche effectivement l'insertion de Bcl-xL dans les nanodisques (Fig 75A).



De plus, Bcl-xLAC perd la capacité à prévenir la précipitation de Bax et à stimuler son insertion dans les nanodisques (fig 75C et D). Cette observation suggère que l'insertion de Bax dans les nanodisques est dépendante de l'insertion de Bcl-xL, montrant que les deux protéines sont co-insérées dans les nanodisques. Cette co-insertion est dépendante de l'insertion de l'hélice α C-terminale de Bcl-xL.

Afin d'écarter la possibilité d'un effet indésirable lié à la délétion complète de l'hélice C-terminale, nous avons généré un mutant de Bcl-xL dans l'hélice C-terminale, A221R. Garenne et al ont montré que la mutation de l'alanine 221 (A221) en arginine (A221R) dans l'hélice C-terminale de Bcl-xL diminue significativement son insertion dans la MOM. En outre, ce mutant maintient sa capacité à transloquer Bax vers la MOM [254].

Nous avons synthétisé ce mutant en présence de nanodisques et observé qu'il est en majorité non inséré (**fig 75B**), ce qui est cohérent avec les observations de Garenne et al.

Nous avons observé que Bcl-xL A221R perd sa capacité à prévenir la précipitation de Bax et à stimuler son insertion dans les nanodisques, contrairement à Bcl-xL WT (**fig 75C et D**).

Prises ensembles, ces observations suggèrent que Bax et Bcl-xL sont co-insérées dans les nanodisques sous forme d'hétérodimère. Ceci est cohérent avec les données de la littérature montrant que Bcl-xL prévient l'apoptose en formant un hétérodimère inactif avec Bax [107].

7. Bcl-xL prévient la précipitation de Bax en interagissant avec un domaine distinct du domaine «GALLL»

Dans la conformation soluble de Bax, le domaine «GALLL» de l'hélice $\alpha 1$ est masqué par l'ART, et son exposition fait suite au changement conformationnel induit par la bicouche lipidique.

Nous avons précédemment montré que ce domaine est l'un des domaines d'interaction de Bax avec TOM22. L'exposition du domaine «GALLL» initie l'interaction Bax/TOM22 qui aboutit à un changement conformationnel permettant l'insertion de Bax.

A contrario, lorsque Bcl-xL perd sa capacité à s'insérer, elle perd *de facto* sa capacité à transloquer et stimuler l'insertion de Bax dans les nanodisques (**fig 75D**). Ceci montre que les deux protéines sont insérées sous forme d'hétérodimère dont la stabilité est assurée par l'insertion de l'hélice α C-terminale de Bcl-xL. Les mécanismes par lesquels Bcl-xL et TOM22 stimulent l'insertion de Bax sont donc deux mécanismes distincts. On peut alors envisager la possibilité que les mécanismes de prévention de la précipitation et donc de translocation de Bax dans les nanodisques soient également différents.

Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé des co-immunoprécipitations de Bax et Bcl-xL en présence ou en absence de nanodisques, afin d'évaluer si l'interaction entre les deux protéines est dépendante de l'exposition du domaine «GALLL».

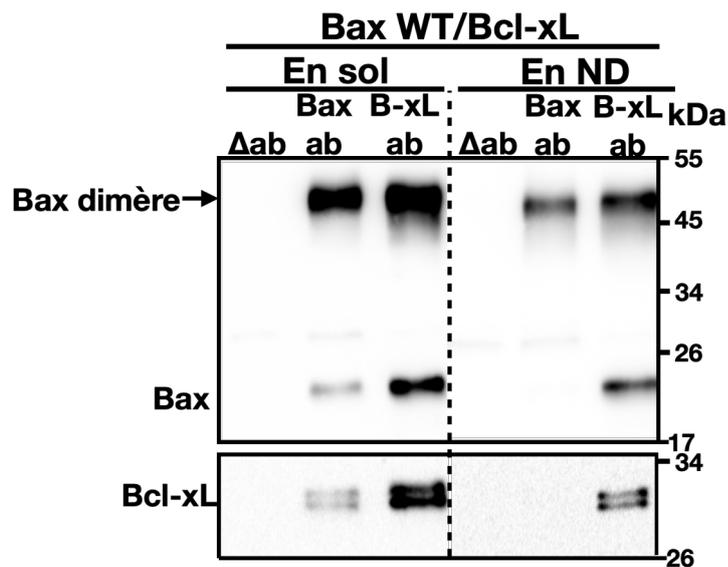


Figure 76 – Bax WT et Bcl-xL sont co-immunoprécipitées en solution et en nanodisques

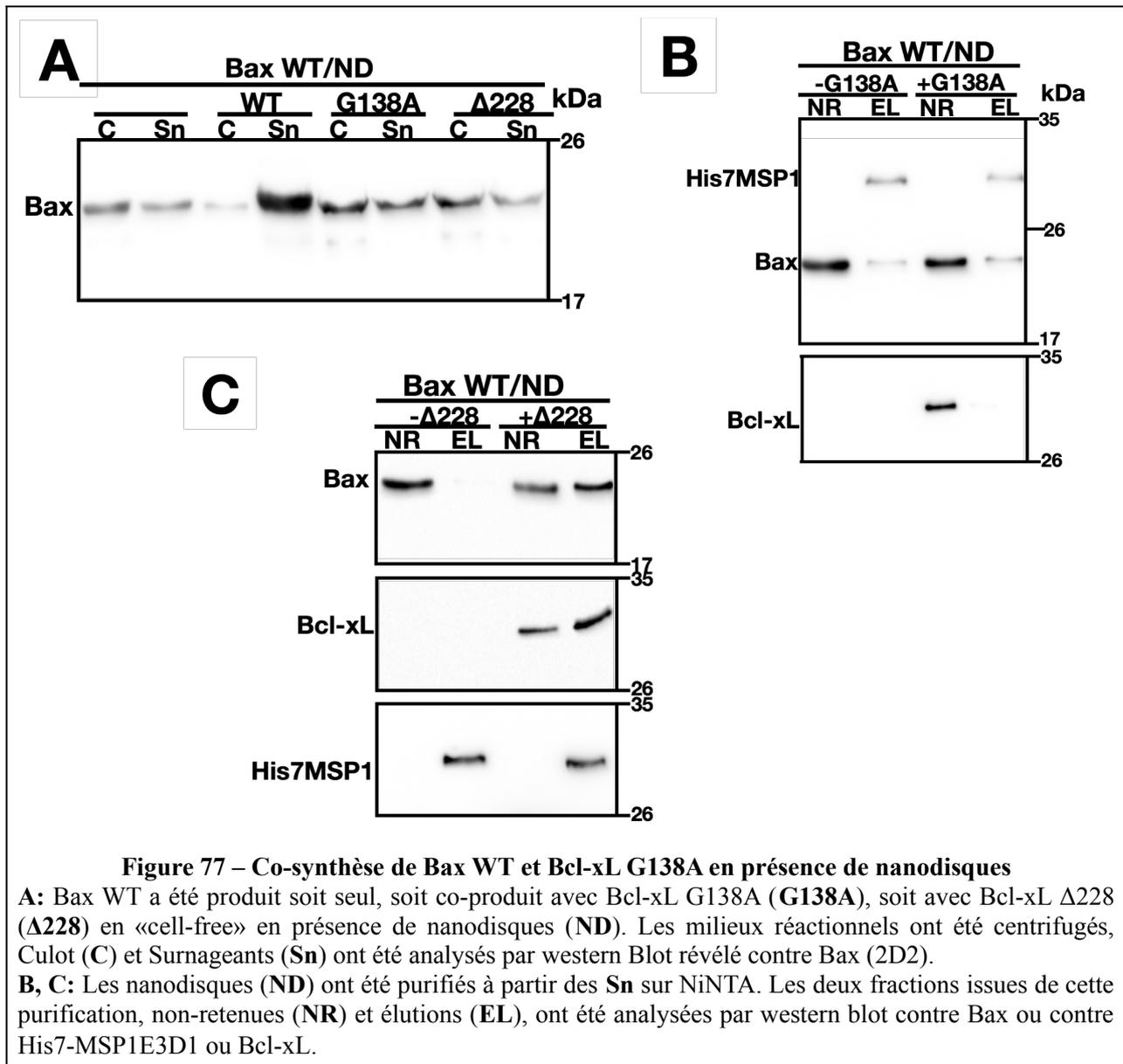
Bax WT et Bcl-xL ont été co-produits en «Cell-free» en absence (**En sol**) ou en présence de nanodisques (**En ND**). Les milieux réactionnels ont été centrifugés, les Culots (C) ont été éliminés et les nanodisques ont été purifiés à partir des fractions surnageants (Sn) de la condition de production en présence de ND. La fraction éluat et la fraction Sn de la condition de production sans ND ont été incubées sur la nuit en présence d'anticorps anti-Bax (**Bax ab**), ou en présence d'anticorps anti-Bcl-xL (**B-xL ab**) ou sans anticorps (**Δab**). Les immunoprécipitations ont été réalisées sur des billes d'agarose couplées à la protéine A et analysées par western blot révéler contre Bax ou contre Bcl-xL.

Nous avons observé qu'il est possible de co-immunoprécipiter Bax et Bcl-xL en absence de nanodisques mais aussi après leur insertion dans les nanodisques (**fig 76**). Ces observations soutiennent l'hypothèse que la prévention de la précipitation de Bax par Bcl-xL n'est pas dépendante de l'exposition du domaine «GALLL».

De plus, le fait que l'interaction Bax/Bcl-xL soit détectable en nanodisques par co-immunoprécipitation montre que cette interaction est relativement stable. Ceci est cohérent avec les données de la littérature montrant que Bcl-xL peut séquestrer Bax dans la MOM en formant un hétérodimère stable avec ce dernier [108].

En solution, les domaines impliqués dans l'interaction Bax/Bcl-xL sont connus. Le domaine BH3 de Bax (hélice $\alpha 2$) s'engage dans le sillon hydrophobe formé par les domaines BH1, BH2 et BH3 de Bcl-xL [105].

Pour tester l'implication de cette interaction dans la prévention de la précipitation de Bax, nous avons généré un mutant de Bcl-xL, G138A. Il a été montré que la mutation de la glycine 138 (G138) en alanine (G138A) entraîne une perte d'interaction entre Bcl-xL et Bax [106] en solution.



Nous avons observé que Bcl-xL G138A perd la capacité à prévenir la précipitation de Bax et à stimuler son insertion dans les nanodisques (**fig 77A et B**). Cependant, de façon inattendue, le mutant Bcl-xL G138A n'est pas inséré dans les nanodisques; nous ne pouvons donc conclure que la perte de prévention de la précipitation de Bax soit bien due à la perte d'interaction avec Bax. Néanmoins, cette observation confirme que l'insertion de Bax dans les nanodisques est dépendante de l'insertion de Bcl-xL.

Plusieurs études ont mis en évidence la capacité de Bcl-xL à rétrotransloquer Bax depuis la MOM vers le cytosol [109], [110].

Todt et al, ont mis en évidence que cette rétrotranslocation est dépendante de l'hélice α C-terminale de Bcl-xL, plus précisément des quatre derniers résidus de cette hélice. En effet, le mutant Bcl-xL Δ 228 dépourvu de ces quatre résidus était incapable de rétrotransloquer Bax [110].

Lorsque Bax et Bcl-xL WT sont co-synthétisés en présence de nanodisques, Bcl-xL assure la translocation de Bax. Néanmoins, une fraction représentant la moitié de Bax n'est pas insérée (**fig 75D**). On pourrait alors envisager que, à cause du phénomène de rétrotranslocation, une partie importante de Bax se relocalise hors des nanodisques.

Dans le but de tester cette hypothèse, nous avons co-synthétisé Bax et Bcl-xL Δ 228 en présence de nanodisques.

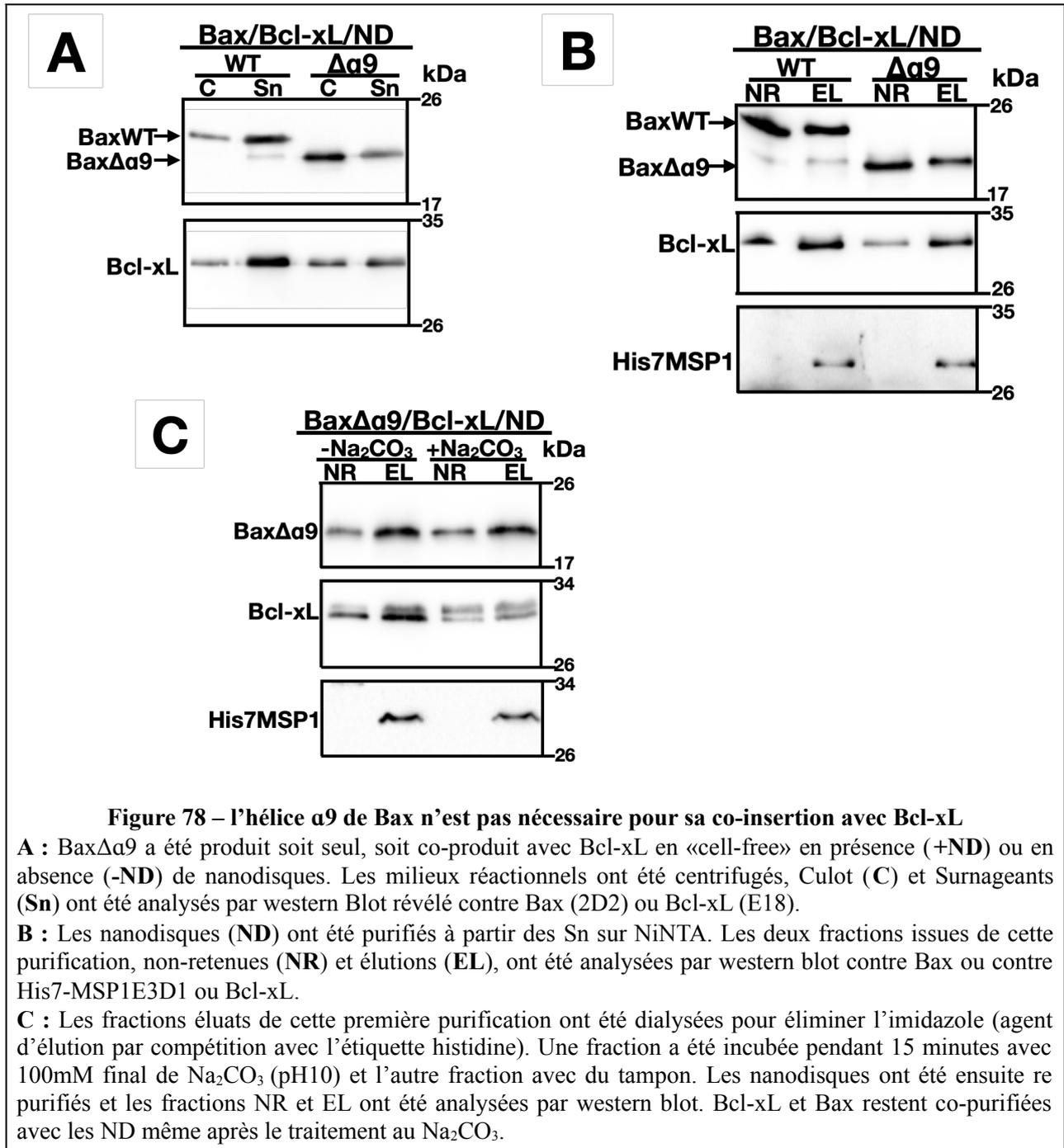
Nous avons observé que Bax et Bcl-xL Δ 228 sont co-purifiées de façon plus importante avec les nanodisques (**fig 77C**). Ceci suggère une co-insertion plus importante de l'hétérodimère Bax/Bcl-xL Δ 228 comparé à l'hétérodimère Bax/Bcl-xL ce qui est cohérent avec les données de Todt et al.

Il est intéressant de noter que l'existence de ce processus de rétrotranslocation de Bax par Bcl-xL, initialement mis en évidence dans des cellules humaines [109] avait pu être confirmée dans des cellules de levure [108] suggérant qu'il ne dépendait que des propriétés intrinsèques des deux protéines. Cette suggestion est confirmée par nos expériences qui montrent que la rétrotranslocation peut être mise en évidence dans un modèle minimal ne contenant que les deux protéines et une bicouche lipidique.

8. L'hélice α 9 de Bax n'est pas indispensable pour sa co-insertion avec Bcl-xL

Nos données ont montré que Bax et Bcl-xL sont co-insérées dans les nanodisques sous forme d'hétérodimère. Nous avons vu que cette co-insertion est dépendante de l'insertion de l'hélice C-terminale de Bcl-xL. Le traitement des nanodisques contenant l'hétérodimère Bax/Bcl-xL au carbonate de sodium a montré que les deux protéines sont insérées dans la bicouche lipidique (**fig 74**). Ceci montre que Bax a subi un changement conformationnel conduisant à son insertion.

Dans le chapitre II nous avons montré que l'insertion de Bax dans les nanodisques stimulée par TOM22 est conduite par l'insertion de son hélice α 9. L'insertion de cette hélice représente l'aboutissement du changement conformationnel induit par TOM22. Afin de tester l'implication de l'insertion de cette hélice dans la co-insertion de l'hétérodimère Bax/Bcl-xL, nous avons co-synthétisé Bax Δ α 9 et Bcl-xL en présence de nanodisques.



Nous avons observé que la précipitation de BaxΔα9 n’est pas prévenue par Bcl-xL (**fig 78A**). Par contre, la stimulation, par Bcl-xL, de son association avec les nanodisques est maintenue (**fig 78B**). De plus, comme l’hétérodimère BaxWT/Bcl-xL, l’hétérodimère BaxΔα9/Bcl-xL est résistant au traitement au carbonate de sodium (**fig 78C**) montrant que BaxΔα9 est co-insérée avec Bcl-xL. Ceci suggère: (i) que l’hélice α9 de Bax n’est pas nécessaire à sa co-insertion avec Bcl-xL et (ii) qu’un ou plusieurs autres domaines de Bax sont suffisants. Ces observations confirment que les

mécanismes de translocation et d'insertion de Bax dans les nanodisques induits par TOM22 d'une part et Bcl-xL d'autre part sont distincts.

9. Discussion du chapitre III

L'observation majeure de ce chapitre est que Bcl-xL prévient la précipitation de Bax induite par les nanodisques et stimule son insertion.

Les mécanismes par lesquels Bcl-xL inhibe la fonction pro-apoptotique de Bax sont débattus dans la littérature. Edlich et al ont proposé que le phénomène de rétrotranslocation de Bax par Bcl-xL était un aspect majeur de l'inhibition de la perméabilisation de la MOM dépendante de Bax [109]. Minn et al ont montré que la formation d'un hétérodimère Bax/Bcl-xL soluble et inactif empêche la relocalisation de Bax vers la MOM [107]. A l'inverse, Renault et al ont montré que la surexpression de Bcl-xL entraîne la formation d'hétérodimères Bax/Bcl-xL inactifs mais localisés dans la MOM [108]. De plus, l'interaction entre Bax et Bcl-xL induit un changement conformationnel de Bax qui rend les cellules plus sensibles aux molécules BH3 mimétiques [187], [108].

Nos données ont montré que Bax et Bcl-xL sont co-immunoprécipitées en solution et en nanodisques. Ceci est cohérent avec les observations de Minn et al, et Renault et al. Cependant, lorsque Bcl-xL perd sa capacité à s'insérer dans une membrane (Bcl-xL A221R, Bcl-xL Δ C), il perd la capacité à prévenir la précipitation de Bax (**fig 75C**). Il a été montré que l'hélice C-terminale de Bcl-xL est impliquée dans la stabilité des homodimères de Bcl-xL [255]. On peut alors envisager que cette hélice soit également importante pour la stabilité des hétérodimères Bax/Bcl-xL. Ceci pourrait expliquer pourquoi ces mutants perdent la capacité à protéger Bax contre la précipitation induite par les nanodisques.

Dans le chapitre II, nous avons montré que TOM22 induit un changement conformationnel de Bax qui entraîne le délogement et l'insertion de son hélice α 9. Ceci conduit à l'insertion de Bax sans que TOM22 lui-même soit forcément inséré. A l'inverse nous avons observé que l'insertion de Bcl-xL est requise pour l'insertion de Bax (**fig 75D**). Bax et Bcl-xL sont donc co-insérées sous forme d'un hétérodimère. Si l'hélice α C-terminale de Bcl-xL est requise pour la co-insertion, nous avons observé que l'hélice α 9 C-terminale de Bax n'est pas indispensable pour la co-insertion (**fig 78C**). Ceci montre que d'autres domaines de Bax sont impliqués dans sa co-insertion avec Bcl-xL, ce qui est cohérent avec l'observation que l'insertion de l'hétérodimère Bax/Bcl-xL dans la MOM implique les hélices α 5, α 6 et α 9 de Bax et l'hélice α C-terminale de Bcl-xL [256]. Même si l'hélice α 9 de Bax n'est pas indispensable pour la co-insertion, le fait que la précipitation de Bax Δ α 9 soit

moins protégée par Bcl-xL suggère que l'hélice $\alpha 9$ de Bax est impliquée dans l'interaction avec Bcl-xL (fig 78A). Ceci est cohérent avec les observations de Arokium et al montrant que les mutants de Bax dans l'extrémité C-terminale sont moins sensibles à l'inhibition par Bcl-xL [155]. L'ensemble de ces données montre clairement que les mécanismes de translocation et d'insertion de Bax dans les nanodisques induit par TOM22 et par Bcl-xL sont distincts. L'aboutissement du changement conformationnel induit par TOM22 est le dégagement de l'hélice $\alpha 9$, étape obligatoire vers l'insertion de Bax dans une conformation propice à l'oligomérisation. A l'inverse, Bax et Bcl-xL sont co-insérées sous forme d'un hétérodimère inactif de façon indépendante de l'insertion de l'hélice $\alpha 9$ de Bax.

Un autre processus permettant de réguler la localisation mitochondriale de Bax par Bcl-xL est la rétrotranslocation. Ce processus a été mis évidence *in cellulo* par des méthodes de microscopie [109], [110]. Cependant, les mécanismes sous-tendant ce processus restent peu décrits. Todt et al ont montré que la délétion des quatre derniers résidus de Bcl-xL suffit à abolir la rétrotranslocation de Bax.

Nous avons montré que, même si Bcl-xL stimule l'insertion de Bax dans les nanodisques, une fraction importante de Bax reste non associée aux nanodisques. On peut envisager que cette fraction correspond à du Bax ayant subi une rétrotranslocation. En effet, nous avons observé que le mutant Bcl-xL Δ 228 décrit par Todt et al induisait l'association d'une fraction plus importante de Bax aux nanodisques que Bcl-xL WT. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la fraction de Bax non associée aux nanodisques correspondait bien à du Bax rétrotransloqué. De plus nous avons observé que le mutant Bcl-xL Δ 228 exprimé seul ne s'insère pas dans les nanodisques (**fig 73B**), ce qui est cohérent avec les observations de Todt et al montrant une localisation cytosolique de ce mutant. A l'inverse quand il est co-produit avec Bax, il est fortement inséré dans les nanodisques (**fig 77C**). Ceci met en lumière le fait qu'en plus du processus de co-insertion, il existe un processus de co-adressage, chacun des deux partenaires stimulant l'adressage de l'autre.

IV. Potentialisation de l'effet des BH3-mimétiques par TOM22

1. Contexte

L'apoptose est un processus vital dans le maintien de l'homéostasie tissulaire; un échec dans sa régulation peut favoriser le développement de cancers, et contribuer à l'apparition de maladies auto-immunes et dégénératives [244]. En 1988, Vaux et al, ont observé que l'oncogénicité faisant suite à la surexpression de la protéine Bcl-2 dans les lymphomes B2 était liée au fait que cette dernière promeut la survie cellulaire (activité anti-apoptotique) et non l'inhibition de la prolifération des cellules [89]. Cette observation a mis en évidence un lien entre le défaut dans le processus de l'apoptose et la tumorigenèse. En effet, grâce à son activité anti-apoptotique, la surexpression de Bcl-2 contribuait à maintenir les cellules en vie malgré des signaux apoptotiques.

En effet, «un programme apoptotique défectueux confère aux cellules néoplasiques naissantes de multiples avantages sélectifs. Les cellules peuvent persister dans des niches hostiles (par exemple, où les cytokines ou l'oxygène sont limités), échapper à la mort qui est souvent imposée comme un mécanisme de sécurité par d'autres changements oncogéniques et évoluer vers des dérivés plus agressifs. Enfin, une apoptose défectueuse facilite la formation de métastases, car les cellules peuvent ignorer les signaux de restriction de leurs voisines et survivre au détachement de la matrice extracellulaire» (Cory and Adams, 2002).

De plus, l'altération de l'apoptose affecte également la manière dont les cellules répondent aux thérapies (chimiothérapies et radiothérapies) qui en majorité induisent des dommages pris en charge par les effecteurs de la voie mitochondriale de l'apoptose. La compréhension des événements moléculaires qui contribuent à l'apoptose et de la manière dont les tumeurs échappent à la mort apoptotique, fournit un paradigme pour expliquer la relation entre la génétique du cancer et la sensibilité au traitement, et a permis une approche plus rationnelle de la conception et de la thérapie des médicaments anticancéreux [257] [182] [184] (pour revues).

Il est important de rappeler que les protéines de la famille de Bcl-2 contrôlent la voie mitochondriale de l'apoptose *via* un réseau d'interactions entre les membres de la famille. Ces interactions inter-membres dans la famille sont possibles grâce à leurs domaines d'homologie BH

(pour Bcl-2 Homology domain). Il est désormais largement admis que les membres anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-xL inhibent l'apoptose en séquestrant les membres pro-apoptotiques tels que Bax et Bak. Les protéines à domaine BH3 seulement telles que Bad, Bim et PUMA peuvent déplacer cette interaction en liant leur domaine BH3 dans le sillon hydrophobe des protéines anti-apoptotiques. Ceci permet la libération des protéines pro-apoptotiques et, à terme, la perméabilisation de la MOM. Les protéines à domaine BH3 seulement peuvent être divisées en deux groupes (**fig 79A**) :

-Les activateurs directs tels que Bid, Bim et PUMA qui non seulement peuvent directement activer les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, mais aussi inhiber les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL.

-Les sensibilisateurs tels que Bad, BMF ou NOXA, qui n'ont pas la capacité d'activer directement Bax et Bak, mais qui ont une action antagoniste plus ou moins sélective sur les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL. Ils occupent ainsi la poche hydrophobe de ces dernières, empêchant la fixation du domaine BH3 des activateurs directs [257].

A

Les protéines à domaines BH3 seulement

Les protéines anti-apoptotiques	Les activateurs		Les sensibilisants				
	BIM	BID	BAD	BMF	HRK	NOXA*	PUMA*
BCL-2							
BCL-xL							
BCL-w							
MCL-1							
A1							

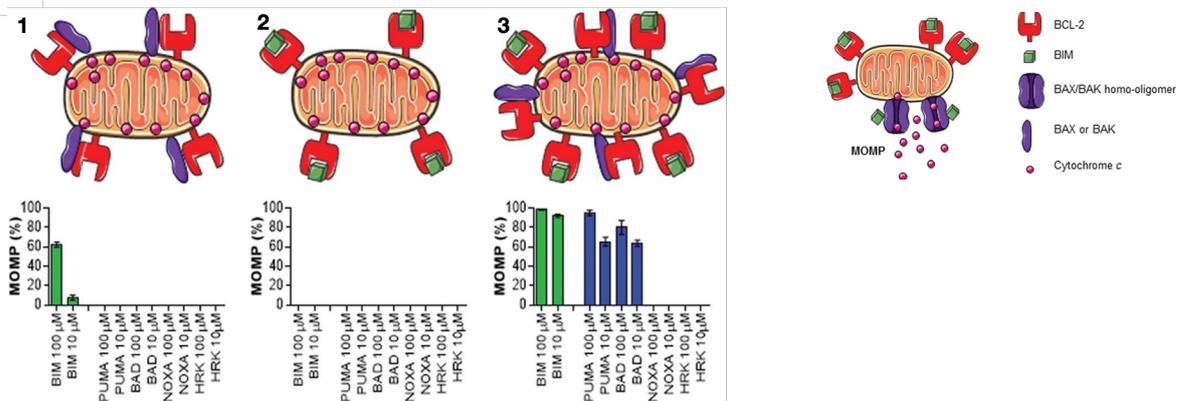
B

Figure 79 – Mécanismes d'évitement de l'apoptose par les cellules cancéreuses

A: Les protéines à domaine BH3 seulement sont divisées en deux groupes : les activateurs, Bim, Bid et PUMA (des données récentes montrent que PUMA peut être considéré comme un activateur), et les sensibilisateurs, Bad, BMF, HRK et NOXA. la couleur rose traduit une forte affinité, et la couleur orange une affinité faible ou nulle pour les protéines anti-apoptotiques.

B: Les trois mécanismes anti-apoptotiques possibles dans les cellules cancéreuses sont décrits dans le texte. L'initiation de l'apoptose est mesurée par le pourcentage de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) en fonction de la concentration et la catégorie de la protéine à domaine BH3 seulement ajoutée (activateur ou sensibilisateur) [257].

Grâce à ces connaissances sur les protéines à domaine BH3 seulement, Deng et al (2007) [258] ont proposé trois mécanismes possibles selon lesquels les cellules cancéreuses peuvent échapper au processus d'apoptose (**fig 79B**) :

1) La régulation à la baisse des protéines à BH3 seulement activatrices (Bid, Bim, et PUMA). Dans ces conditions, Bax et Bak ne seront pas activées et donc ne pourront pas promouvoir la perméabilisation de la MOM. Seuls les peptides BH3 des activateurs, et pas ceux des sensibilisateurs, pourront rétablir l'action de Bax et Bak (**fig 79B graphe 1**).

2) L'inactivation ou la régulation à la baisse de Bax et Bak, ce qui aura pour effet de prévenir la perméabilisation de la MOM. Dans ce cas, aucun des peptides BH3 (ni les activateurs, ni les sensibilisateurs) ne réactive la perméabilisation de la MOM (**fig 79B graphe 2**).

3) La régulation à la hausse des protéines anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl-xL. Dans ces conditions, tous les effecteurs de la perméabilisation de la MOM (Bax, Bak et les protéines à BH3 seulement) sont présents mais sont neutralisés par les membres anti-apoptotiques de la famille. Dans ce cas, les peptides BH3 des activateurs directs et des sensibilisateurs seront efficaces pour rétablir la perméabilisation de la MOM.

Ainsi, il apparaît que les protéines à BH3 seulement représentent la clé permettant de résoudre les problèmes liés au fonctionnement de la machinerie apoptotique dans les cellules cancéreuses.

Plusieurs molécules mimant l'action de ces domaines BH3 ont été développées. C'est le cas de l'ABT-737 et ABT-263 qui ciblent Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w, de l'ABT-199 qui cible spécifiquement Bcl-2, ou du WEHI-539 qui cible spécifiquement Bcl-xL [259]. Certaines de ces molécules, telles que l'ABT-199 sont actuellement utilisés en clinique comme agents chimiothérapeutiques.

Deux modes d'activation de Bax ont été décrits dans la littérature :

-Un mode direct qui implique l'action des protéines à BH3 seulement activatrices. Elles induisent un changement conformationnel suffisant pour promouvoir l'insertion et l'oligomérisation de Bax dans la MOM [220] [223] (pour revues).

-Un mode indirect qui implique la rupture de l'interaction entre Bax et un partenaire anti-apoptotique tel que Bcl-xL. Pour neutraliser Bax, Bcl-xL va former un hétérodimère avec ce dernier dans la MOM. L'ajout d'un BH3 mimétique permet de rompre l'interaction et de libérer la protéine Bax. Bax ainsi libéré présente une conformation déjà amorcée propice à son insertion et à son oligomérisation dans la MOM de façon indépendante des activateurs directs (PUMA dans cette étude) [187].

De plus, Renault et al (2015) ont montré que dans des cellules pro-lymphocytaires FL5.12 surexprimant Bcl-xL, la quantité de Bax localisée à la mitochondrie augmente de façon significative. Dans ces conditions, ces cellules sont dans un état d'amorçage à l'apoptose avancé en comparaison des cellules parentales ne surexprimant pas Bcl-xL. Elles sont en effet plus sensibles au BH3 mimétique ABT-737 comparé aux cellules parentales [108]. Ces observations montrent que de façon paradoxale, les cellules cancéreuses surexprimant les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2 ou Bcl-xL) comme stratégie d'échappement à l'apoptose, s'auto-amorcent pour l'apoptose (**fig 23 cf introduction**).

Dans le chapitre II de ce manuscrit, nous avons mis en évidence que l'insertion de Bax dans les nanodisques est dépendante de la présence d'un partenaire mitochondrial, TOM22 ou Bcl-xL.

Bax et Bcl-xL sont co-insérées vraisemblablement sous forme d'hétérodimère inactif. *A contrario*, TOM22 stimule l'insertion de Bax dans une conformation propice à son oligomérisation. Nous avons observé que l'insertion de Bax dans les nanodisques est dépendante de l'insertion de son hélice $\alpha 9$ C-terminale. Cette hélice est stabilisée dans une poche hydrophobe dans la forme soluble de la protéine. Les activateurs directs que nous avons testés (BimBH3 et BidBH3) ne sont pas suffisants pour libérer cette hélice de la poche hydrophobe et, par conséquent, ne stimulent pas l'insertion de Bax dans les nanodisques. TOM22 est le seul partenaire testé dans ce travail qui a la capacité de libérer cette hélice de la poche hydrophobe et ainsi promouvoir l'insertion de Bax dans les nanodisques.

Nous nous sommes donc interrogés sur une potentielle action de TOM22 dans l'insertion de Bax dans la MOM après l'action des BH3-mimétiques. L'objectif de ce troisième chapitre est de déterminer si, suite à l'action des BH3-mimétiques libérant Bax de son interaction avec Bcl-xL, Bax requiert une interaction avec Tom22 pour s'insérer dans la MOM.

Pour cela, nous avons conçu une variante de notre système *in vitro* permettant d'évaluer le transfert de Bax depuis des nanodisques contenant l'hétérodimère inactif Bax/Bcl-xL vers des nanodisques vides, ou contenant TOM22.

2. Implication de Tom22 dans l'action des BH3-mimétiques

Bcl-2 et Bcl-xL sont surexprimées dans la plupart des cellules cancéreuses. Paradoxalement, dans ces cellules, la quantité de Bax peut également augmenter [260] [261]. En conditions non-apoptotiques, la surexpression de Bcl-2 ou de Bcl-xL augmente la localisation mitochondriale de Bax [252] [108], mais augmente aussi la rétrotranslocation [109] [110], ce qui stimule un équilibre dynamique de la répartition de Bax entre les deux compartiments, qui peut être finement régulé par d'autres facteurs, tels que la phosphorylation de Bax [167]. Cet équilibre dynamique est aussi très sensible à la rupture des interactions entre Bax et Bcl-2 ou Bcl-xL [187] [108].

Les molécules dites "BH3-mimétiques" permettent de rompre les interactions entre Bax et les protéines anti-apoptotiques, et donc de déclencher l'apoptose. Pour évaluer si l'insertion de Bax dans la MOM après l'action des BH3 mimétiques dépend de TOM22, nous avons incubé des nanodisques étiquetés his7 contenant l'hétérodimère Bax/Bcl-xL avec des nanodisques étiquetés strepII soit vides, soit contenant TOM22. Après l'ajout du WEHI-539 (BH3 mimétique ciblant Bcl-xL), les nanodisques étiquetés strep II ont été purifiés. Ce dispositif expérimental nous permet de mesurer un transfert potentiel de Bax d'un type de nanodisques vers l'autre et donc d'un partenaire à un autre.

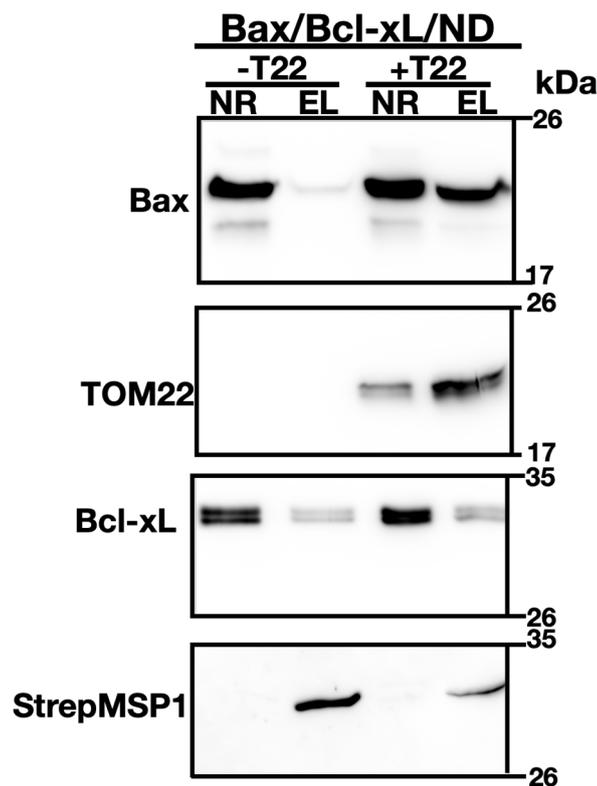
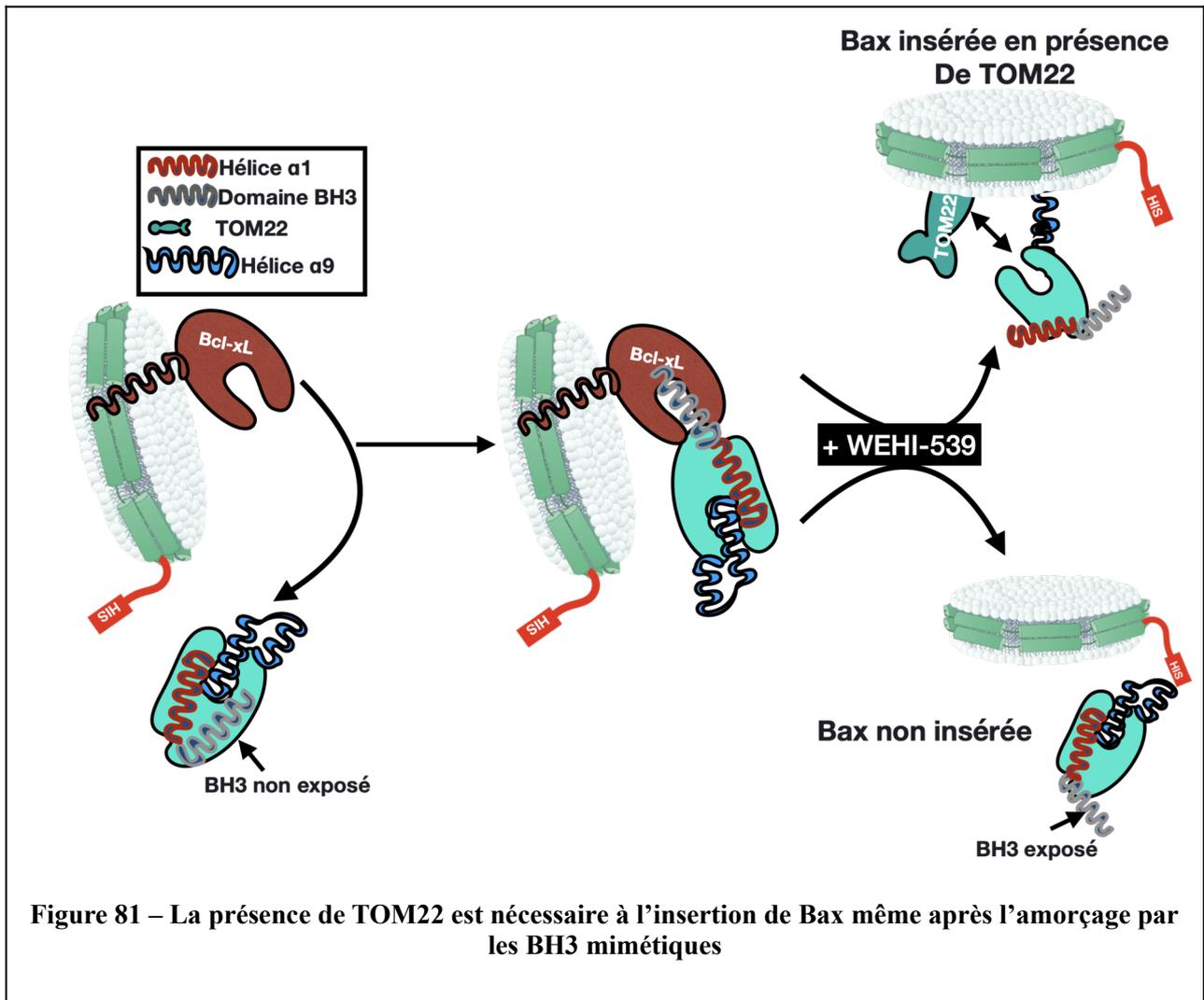


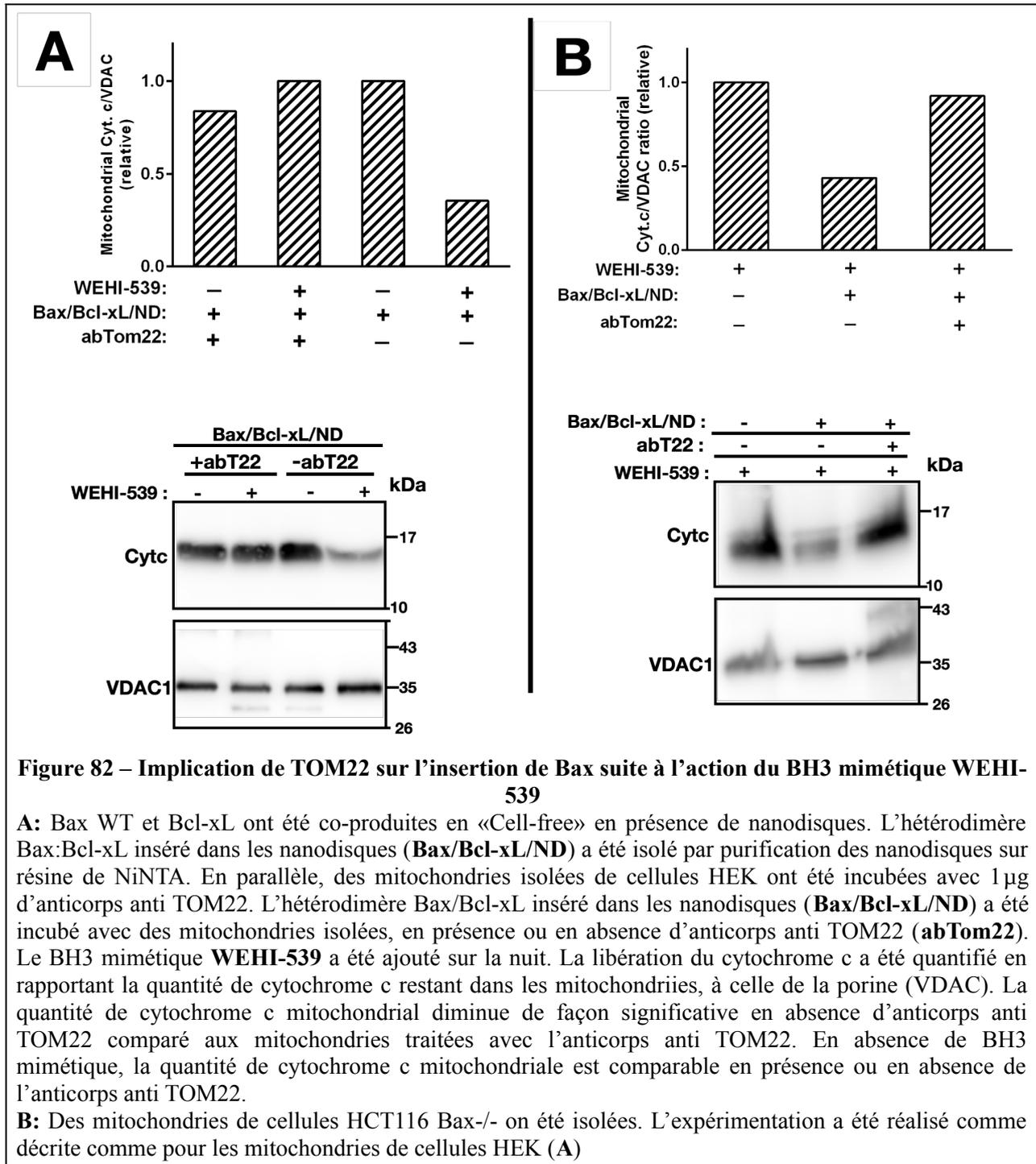
Figure 80 - reconstitution de l'action des BH3 mimétiques *in vitro*

Bax WT et Bcl-xL ont été co-produits en «Cell-free» en présence de nanodisques étiquetés histidine. Après purification sur résine NiNTA, les nanodisques contenant l'hétérodimère Bax/Bcl-xL ont été incubés avec des nanodisques étiquetés strepII vides (condition «-T22») ou contenant TOM22 (condition «+T22»). Après 3h d'incubation avec le WEHI-539, les nanodisques strepII ont été purifiés sur résine step-tactin, les fractions non-retenues (NR) et éluats (EL) ont été analysées par western blot. Bax est co-purifiée avec les nanodisques strepII contenant TOM22, mais pas avec les nanodisques strepII vides.

Nous avons observé qu'après l'action du WEHI-539, Bax est co-purifiée avec les nanodisques étiquetés strepII contenant TOM22 mais pas avec les nanodisques strepII vides (**fig 80**). Ceci suggère que même si l'interaction Bax/Bcl-xL libère Bax sous une forme amorcée [187], cette amorçage n'est pas suffisant pour permettre l'insertion de Bax dans les nanodisques. Par contre, la présence de TOM22 dans les nanodisques promeut l'insertion de Bax pré-amorcée par Bcl-xL. Ceci suggère que TOM22 est un partenaire indispensable pour que Bax acquière sa conformation propice à l'insertion. Nous avons précédemment mis en évidence que l'insertion de Bax dans les nanodisques est conditionnée à l'insertion de son hélice $\alpha 9$ C-terminale. Dans notre système *in vitro*, TOM22 est le seul partenaire de Bax capable de libérer cette hélice $\alpha 9$ C-terminale depuis la poche hydrophobe où elle est stabilisée. L'échec de l'insertion de Bax pré-amorcée par Bcl-xL dans les nanodisques vides suggère donc que l'amorçage observé par Gautier et al (2011) [187] n'induit pas obligatoirement la libération de l'hélice $\alpha 9$ C-terminale de Bax (**fig 81**).



Une éventuelle implication de Tom22 dans l'insertion de Bax suite à l'amorçage ne pouvait pas être détectée dans les expériences rapportées par Gautier et al, qui était réalisées en présence de mitochondries (*in vitro* ou *in cellulo*). Nous avons donc mis au point un protocole expérimental basé sur l'utilisation de mitochondries isolées afin de tester l'implication de Tom22 dans l'insertion de Bax après amorçage.



Nous avons refait la même expérience que dans la **figure 80** en utilisant cette fois des mitochondries isolées comme membranes réceptrices de Bax après l’action du BH3 mimétique WEHI-539 sur l’hétérodimère Bax/Bcl-xL en nanodisques. La délétion de TOM22 étant létale pour les cellules, nous avons généré un contrôle négatif de mitochondries sans TOM22, en saturant la partie cytosolique de TOM22 par son anticorps comme décrit par Bellot et al [143]. Des nanodisques contenant l’hétérodimère Bax/Bcl-xL ont été incubés avec des mitochondries isolées

de cellules HEK en présence ou absence de l'anticorps anti-TOM22. La libération de Bax depuis l'hétérodimère Bax/Bcl-xL a été provoquée par l'ajout du BH3 mimétique WEHI-539. L'insertion et l'activité de Bax ont été analysées par quantification du cytochrome c restant dans les mitochondries après l'action du BH3 mimétique.

Nous avons observé qu'en absence de WEHI-539, la quantité de cytochrome c dans les mitochondries reste constante (**fig 82A colonnes 1 et 3**). Ceci est cohérent avec nos précédentes observations montrant que dans les nanodisques, Bax et Bcl-xL forment un hétérodimère stable. De façon intéressante, en présence de WEHI-539, la quantité de cytochrome c dans les mitochondries diminue significativement (**fig 82A colonne 4**). Ceci traduit une perméabilisation de la MOM par Bax suite à la rupture de l'hétérodimère Bax/Bcl-xL inséré dans les nanodisques par le WEHI-539. De façon intéressante, «l'inactivation» de TOM22 par saturation avec son anticorps permet de prévenir le relargage du cytochrome c (**fig 82A colonne 2**). Ceci suggère que l'insertion de Bax dans les mitochondries de cellules HEK nécessite la présence de TOM22 malgré son amorçage dû à la rupture de l'interaction de l'hétérodimère Bax/Bcl-xL par le WEHI-539.

Ces observations confirment les résultats obtenus sur les expériences de transfert de Bax entre deux types de nanodisques (**fig 80**).

Il a été montré que Bax déjà présente dans la MOM pouvait servir de récepteur pour Bax cytosolique [176]. On pourrait alors envisager que l'insertion de Bax dans les mitochondries de cellules HEK soit liée à la présence de Bax endogène. Afin de tester cette hypothèse, nous avons refait cette expérience sur des mitochondries isolées de cellules HCT116 Bax KO. Nous avons observé que, de la même façon que sur les cellules HEK, la perméabilisation de la MOM des mitochondries de ces cellules est dépendante de TOM22 (**fig 82 B**). Ceci montre que la perméabilisation mitochondriale que nous observons n'est pas liée à la présence de Bax endogène.

3. Discussion du chapitre III

Il existe actuellement des travaux visant à cibler Bax dans le but de réactiver l'apoptose dans les cellules cancéreuses [184]. Cependant, la réussite de cette approche repose sur la capacité de Bax à perméabiliser la MOM, donc indirectement sur sa capacité à acquérir une conformation propice à son insertion et à son oligomérisation dans la MOM.

Dans notre système *in vitro*, l'acquisition de cette conformation est dépendante de TOM22. Ce dernier opère sur Bax, un changement conformationnel permettant l'insertion de son hélice α_9 C-terminale dans les nanodisques. Dans les cellules cancéreuses, la surexpression des protéines anti-

apoptotiques, dont Bcl-xL, conduit à la formation d'hétérodimères Bax/Bcl-xL dont on sait qu'ils sont au moins partiellement localisés à la MOM.

L'interaction Bax/Bcl-xL provoque l'amorçage de Bax en induisant un changement conformationnel impliquant un déplacement de son domaine BH3. Gautier et al [187] ont montré que, suite à la rupture de l'interaction Bax/Bcl-xL, le domaine BH3 de Bax initialement enfoui devient exposé; Bax était alors capable de perméabiliser la MOM au cytochrome c. Les auteurs ont donc conclu que Bax était active dans ces conditions.

Les résultats de l'expérience de transfert de Bax réalisée dans notre système *in vitro* sont cohérents avec ces observations. En effet, en absence de WEHI-539, la quantité de cytochrome c mitochondrial reste constante (**fig 82A colonne 1 et 3**). *A contrario*, l'ajout du WEHI-539 déclenche un relargage important de cytochrome c mitochondrial (**fig 82A colonne 4**). Notre système *in vitro* permet ainsi de confirmer que la rupture de l'interaction de l'hétérodimère Bax/Bcl-xL est suffisante pour activer Bax de façon totalement indépendante de ses activateurs directs (BidBH3 ou BimBH3). De plus, notre système *in vitro* nous a permis de mettre en évidence le rôle de TOM22 comme partenaire indispensable dans ce processus. En effet une «inactivation» de TOM22 par la présence de son anticorps est suffisante pour empêcher le relargage du cytochrome c mitochondrial après l'action du WEHI-539 (**fig 82A colonne 2**). Malgré l'activation de Bax suite à la rupture de l'interaction Bax/Bcl-xL par le WEHI-539, TOM22 est nécessaire pour l'acquisition d'une conformation propice à l'insertion et probablement à l'oligomérisation de Bax dans la MOM.

De façon intéressante, l'expérience de transfert de Bax entre nanodisques donne des résultats cohérents avec ceux obtenus sur les mitochondries isolées, et montre, de plus, que TOM22 est suffisante à l'insertion de Bax suite à la rupture de l'interaction Bax/Bcl-xL par le WEHI-539 (**fig 80**).

De nombreuses expériences ont montré que les activateurs directs de Bax étaient suffisants pour promouvoir son insertion et son oligomérisation dans les liposomes [249], [231]. Cependant, nos résultats obtenus sur les nanodisques et les mitochondries montre l'indispensabilité de TOM22 dans ce processus. Ceci corrobore le fait que les nanodisques représentent un modèle membranaire plus représentatif de la membrane mitochondriale externe que les liposomes, pour étudier les mécanismes d'insertion de Bax. La différence entre ces deux modèles pourrait être liée aux contraintes imposées par la protéine d'échafaudage des nanodisques (MSP1). Ces contraintes

entraînent un empilement des lipides plus important dans les nanodisques en comparaison avec les liposomes [233].

Les données que nous avons précédemment obtenues en utilisant les nanodisques comme modèle membranaire, montrent que l'insertion de Bax passe par l'insertion de son hélice $\alpha 9$ C-terminale suite à un changement conformationnel induit par TOM22 (**chapitre II**). Nos observations sur mitochondries isolées montrent que le même mécanisme dépendant de TOM22 est impliqué dans l'insertion et l'oligomérisation de Bax dans la MOM.

Nos données permettent ainsi de souligner un potentiel rôle de TOM22, sous-estimé jusque là, dans la réponse des cellules cancéreuses aux molécules BH3 mimétiques utilisées en recherche et en clinique comme agents chimiothérapeutiques.

Pour rappel, nous avons identifié, grâce aux données recueillies dans la base de données COSMIC, plusieurs mutations somatiques de TOM22 dans différents types de cancers. Dans le chapitre II de ce travail nous avons observé que certains de ces mutants dans les cellules cancéreuses perdent leur capacité à promouvoir l'insertion de Bax dans les nanodisques. Il serait donc intéressant d'investiguer la réponse de ces types de cellules cancéreuses aux BH3-mimétiques. Que les BH3 mimétiques soient efficaces pour restaurer l'apoptose dans les cellules cancéreuses exprimant ces mutants de TOM22 ou pas, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une potentialisation de leur action par des «molécules TOM22 mimétiques» pourrait potentiellement améliorer la restauration de l'apoptose dans ces cellules cancéreuses.

**2ème Partie. Reconstitution de Bax oligomérique en
nanodisques en vue d'études structurales**

1. Contexte

La résolution de la structure monomérique et soluble de Bax élucidée par RMN [118] a représenté un tournant important dans la compréhension des mécanismes qui sous-tendent les changements conformationnels entraînant son insertion et son oligomérisation dans la MOM. Cette structure a notamment permis de confirmer que, comme pour Bcl-xL, les hélices $\alpha 5$ - $\alpha 6$ sont organisées en une structure en épingle à cheveux [92]. Cette organisation est comparable à celle des toxines diphtériques bactériennes qui perméabilisent les membranes en formant des pores [192]. Des études biochimiques réalisées *in cellulo* ont montré que Bax insère son hélice $\alpha 9$ et les hélices $\alpha 5$ - $\alpha 6$ sous forme de structure en épingle à cheveux dans la MOM [192]. À l'inverse, d'autres études montrent une ouverture de l'épingle à cheveux $\alpha 5$ - $\alpha 6$ lors de l'insertion de Bax dans un environnement membranaire [194] [195].

La structure monomérique de Bax a également permis de mettre en évidence certaines zones et résidus susceptibles de jouer un rôle important dans l'insertion de la protéine dans un environnement membranaire, à l'exemple du sillon hydrophobe formée par les trois domaines BH de la protéine qui sert à la stabilisation de l'hélice $\alpha 9$ hydrophobe C-terminale. Cette hélice est rapprochée vers le sillon hydrophobe par l'intermédiaire de la boucle non structurée entre les hélices $\alpha 8$ et $\alpha 9$, et notamment à cause de la proline 168 qui favorise ce rapprochement par la formation d'un coude. La substitution de cette proline 168 par d'autres résidus conduit à des résultats contradictoires selon le modèle d'étude. En effet, dans des cellules de glioblastomes humains, le mutant P168V présente une forte localisation mitochondriale [164]. Des résultats similaires ont été obtenus avec le mutant Bax P168A lorsque ce dernier a été exprimé dans la levure et les cellules HCT116 Bax -/- [155] [165]. Ces observations ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'isomérisation *cis/trans* de la proline 168 pourrait moduler significativement la position de H $\alpha 9$ entre une position "fermée", dans le sillon hydrophobe formé par les trois domaines BH (Bcl-2 Homology domains) et une position "ouverte", où H $\alpha 9$ pourrait interagir avec la bicouche lipidique et/ou un partenaire protéique [218]. À l'inverse, l'expression du mutant Bax P168G dans des cellules MEF conduit à la formation de dimères inactifs qui restent dans le cytosol [153].

La structure d'un dimère de Bax obtenu après son activation par un peptide recouvrant le domaine BH3 de Bid a été résolue par cristallographie aux rayons X, mais cette structure était dépourvue de l'hélice $\alpha 9$. Cette étude a mis en évidence la formation d'une cavité entre les hélices $\alpha 2$, $\alpha 5$ et $\alpha 8$ de Bax formée suite à l'interaction avec le domaine BH3 de Bid. Il s'ensuit une déstabilisation de la structure de la protéine favorisant l'extrusion de l'hélice $\alpha 2$ (domaine BH3) et la dimérisation de la protéine [179].

Cependant, la structure de Bax oligomérique insérée dans un environnement membranaire reste toujours non élucidée. Il a été montré, par des expériences d'électrophysiologie, que le pore formé par les oligomères de Bax fait une taille d'environ 4,6 nm de diamètre, ce qui est suffisant pour permettre la fuite de petites protéines telles que le cytochrome c (3nm) [189]. De façon étonnante, des études de microscopie à haute résolution et de microscopie à force atomique ont montré la formation de pores de grande taille (40 à 100nm de diamètre) qui pourraient correspondre à des stades plus tardifs de l'apoptose [262], [263]. Il est donc important de mettre en place un modèle représentant Bax oligomérique dans un environnement membranaire.

L'un des facteurs limitants pour l'étude structurale de la protéine Bax est la difficulté à la purifier dans les systèmes d'expression hétérologue conventionnels. En effet, dû à la présence de l'hélice $\alpha 9$ transmembranaire, l'expression de Bax pleine longueur dans la bactérie conduit à des rendements peu satisfaisants [264]. Cette difficulté a poussé les investigateurs à travailler avec une version de la protéine dépourvue de son hélice $\alpha 9$ (Bax $\Delta\alpha 9$) qui est plus facile à purifier. Cependant, le rendement ne reste que modestement supérieur à celui obtenu pour Bax pleine longueur [265].

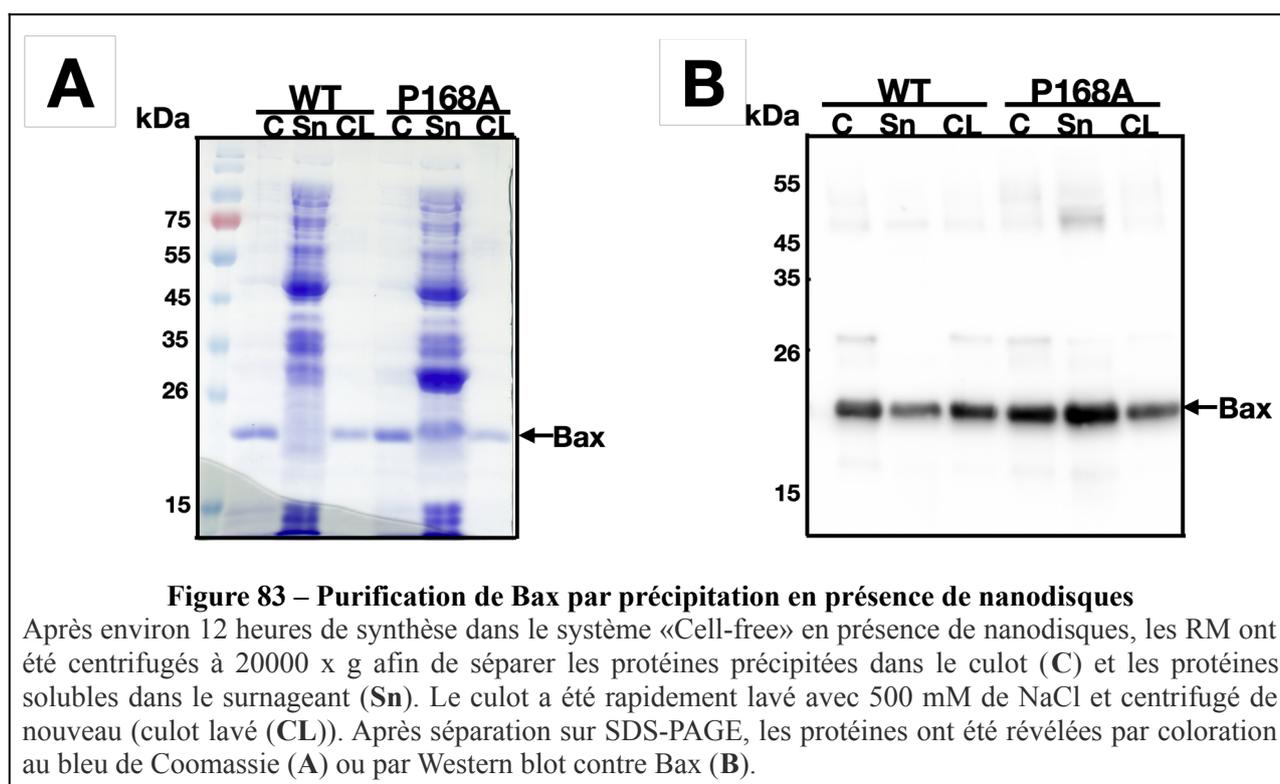
Suzuki et al ont contourné le problème lié au rendement par l'utilisation de fermenteurs à haute capacité pour produire Bax pleine longueur, fusionnée à l'intéine, puis clivée [118]. De plus, comme la majorité des protéines recombinantes produites dans la bactérie, l'expression hétérologue de Bax nécessite des étiquettes afin de la purifier avec un rendement compatible avec des études biochimiques. Comme nous l'avons montré dans cette étude, les extrémités N et C-terminales de Bax jouent des rôles déterminants dans la modulation de son changement conformationnel. Il est donc important de travailler avec Bax natif pleine longueur sans étiquette.

L'objectif de cette deuxième partie a été de mettre au point un modèle représentant Bax oligomérique dans un environnement membranaire (nanodisques).

Le travail présenté dans cette deuxième partie a été majoritairement réalisé avant que les données présentées dans la première partie soient acquises. Ceci concerne notamment l'effet protecteur de TOM22 sur la précipitation de Bax, que nous avons repris dans le paragraphe concernant les expériences de TEM.

2. Bax est précipitée en présence de nanodisques

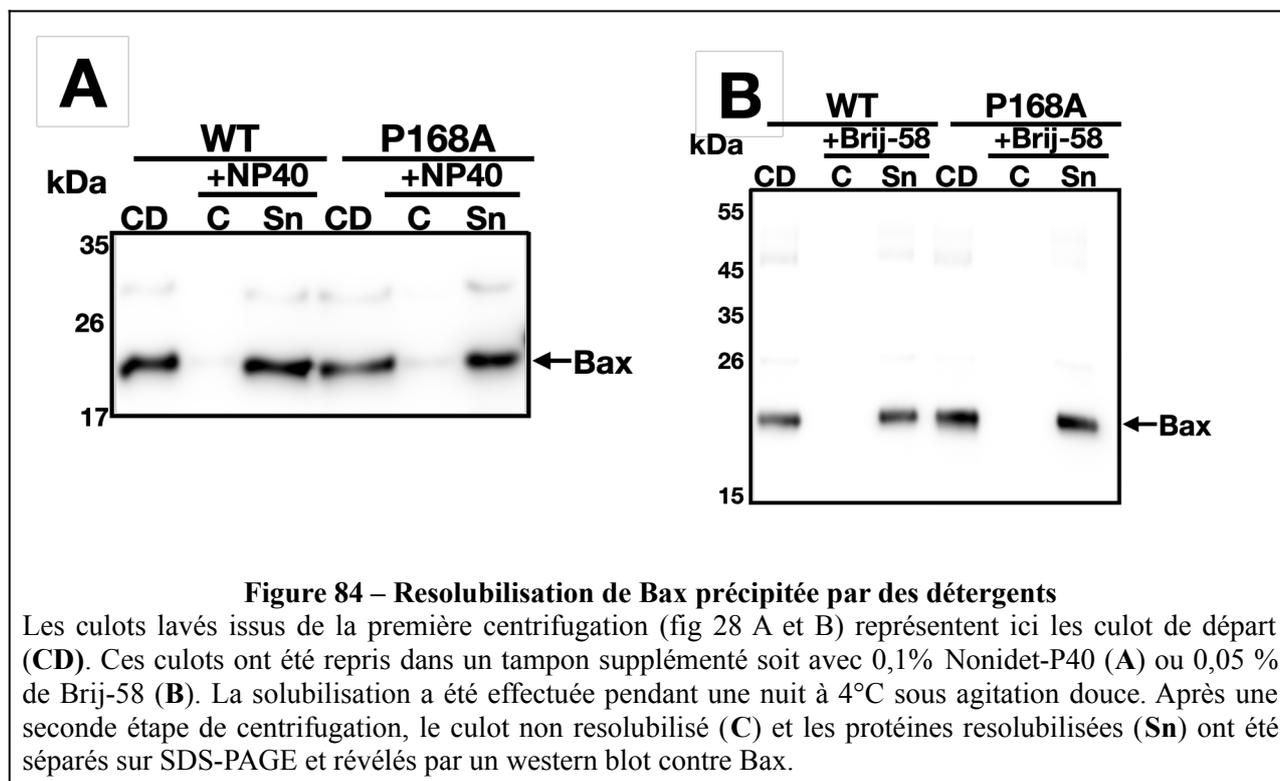
Dans l'optique de la création d'un modèle représentant Bax oligomérique dans un environnement membranaire, nous avons d'abord tenté d'utiliser le système de synthèse protéique «Cell-free» en présence de nanodisques préformés, pour combiner la traduction et l'insertion de Bax WT pleine longueur non-étiquetée dans les nanodisques, afin d'obtenir Bax sous forme de fraction insérée dans un nanodisque. Le raisonnement était que la chaîne peptidique néosynthétisée serait simultanément intégrée dans la bicouche lipidique des nanodisques, de sorte que les domaines hydrophobes ne soient pas exposés à l'environnement aqueux, empêchant ainsi le mauvais repliement et l'agrégation.



Comme déjà décrit dans la première partie de ce manuscrit (**page 70 et 72**), nous avons observé que la présence de nanodisques induisait la précipitation de Bax (**fig 29 et 83**). Même si ce résultat était inattendu, il est intéressant de noter que Bax demeure la protéine majoritairement présente dans ce culot, et que les contaminants résiduels ont été éliminés par lavage du culot (**fig 83A, puits CL**). Ainsi, la précipitation de Bax induite par les nanodisques donne accès à une fraction hautement purifiée de la protéine sans aucune étape de purification supplémentaire. Ce protocole permettrait donc d'obtenir Bax pleine longueur et surtout sans étiquette avec un haut degré de pureté, à condition de pouvoir resolubiliser la fraction de Bax dans le culot.

3. Resolubilisation de Bax précipitée par des détergents

Nous avons donc tenté de resolubiliser les culots pour tester si la protéine pouvait être utilisée pour d'autres études biochimiques. Il avait été précédemment montré que certains détergents pouvaient maintenir Bax en solution sans modifier sa conformation native [266], [172].



Parmi ces détergents, le Nonidet P40 (NP-40) à 0,1% et le Brij-58 à 0,05% ont resolubilisé efficacement BaxWT et BaxP168A (fig 84).

3.1. Conformation de Bax resolubilisée

La possibilité de resolubiliser les culots de Bax représente un argument supplémentaire pour soutenir notre hypothèse selon laquelle la précipitation résulte d'une insolubilisation de la protéine et non d'une agrégation de cette dernière. Dans le premier cas, le changement conformationnel n'est pas irréversible et il sera donc possible de mettre au point un protocole permettant de rétablir la conformation initiale avant précipitation. Dans le second cas, un mauvais repliement de la protéine se produit, exposant les zones hydrophobes des chaînes polypeptidiques naissantes, et conduisant à une agrégation irréversible de la protéine. Dans ce cas, les protéines sont difficilement resolubilisables par des détergents.

Pour évaluer la conformation de Bax ressolubilisée, nous avons réalisé une expérience de dichroïsme circulaire.

Le dichroïsme circulaire est une technique spectroscopique d'analyse couramment utilisée pour étudier la conformation des protéines et des acides nucléiques, mais aussi pour les polysaccharides ou pour les petites molécules. Elle permet l'étude de l'effet de l'environnement sur la structure d'une molécule (pH, dénaturation par les détergents, température, effet de ligand, interactions moléculaires...). Le principe de cette technique de spectroscopie repose sur la capacité d'un échantillon optiquement actif, d'absorber différemment la lumière polarisée circulairement vers la droite et la lumière polarisée circulairement vers la gauche. Le spectre de dichroïsme circulaire correspond à la différence d'absorbance entre ces deux polarisations de lumière, pour chacune des longueurs d'onde. Dans le cas des protéines, la mesure du dichroïsme circulaire dans l'UV lointain (180-260nm, zone d'absorption de la liaison peptidique) contient des informations sur leur structure secondaire (hélices α , feuillets β , coudes et structures désordonnées).

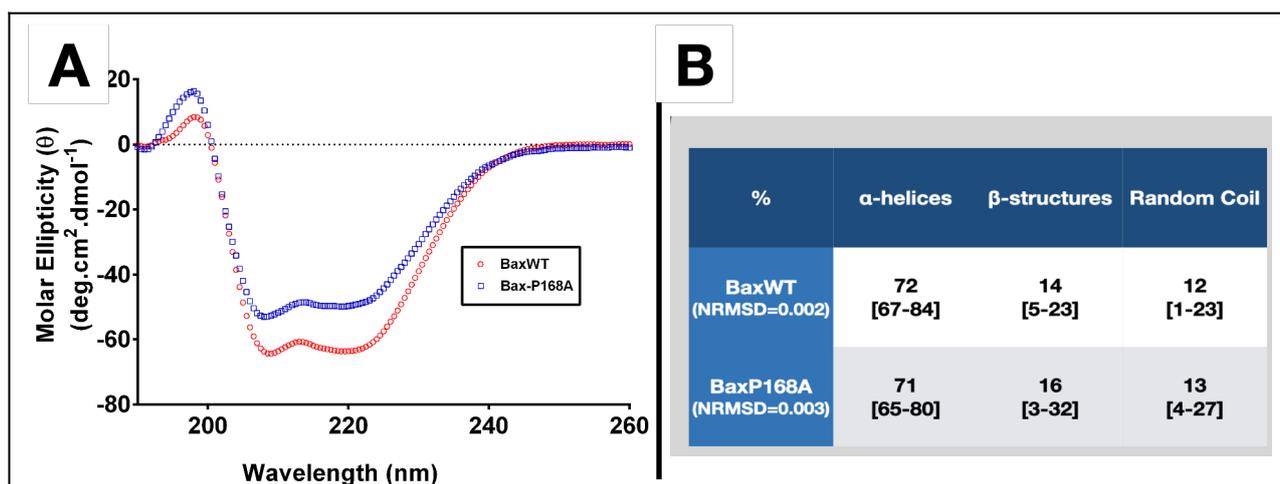


Figure 85 – Analyse de la conformation de Bax ressolubilisée, par dichroïsme circulaire

A: Les protéines ressolubilisées ont été dialysées deux fois contre un tampon phosphate de sodium 40 mM (pH 7,2) afin d'éliminer les ions Cl^- pouvant gêner les acquisitions. La concentration en protéines était de 84 et 67 $\mu\text{g/mL}$ pour BaxWT et BaxP168A, respectivement. Les spectres ont été acquis entre 260 et 190 nm à température ambiante (20 °C) et corrigés avec la ligne de base. Les spectres obtenus pour les deux protéines sont cohérents avec des spectres de protéines structurées en hélices α caractérisés par un minimum à 208nm et un autre à 222nm.

B: Les valeurs ont été calculées avec l'algorithme CDSSTR de Dichroweb. La qualité de la prédiction est considérée comme bonne lorsque le NMRSD (Normalized Root Mean Square Displacement) est inférieur à 0,03. Les valeurs avec la NMRSD la plus basse sont indiquées. Les valeurs entre crochets indiquent la gamme d'autres solutions éventuellement adéquates.

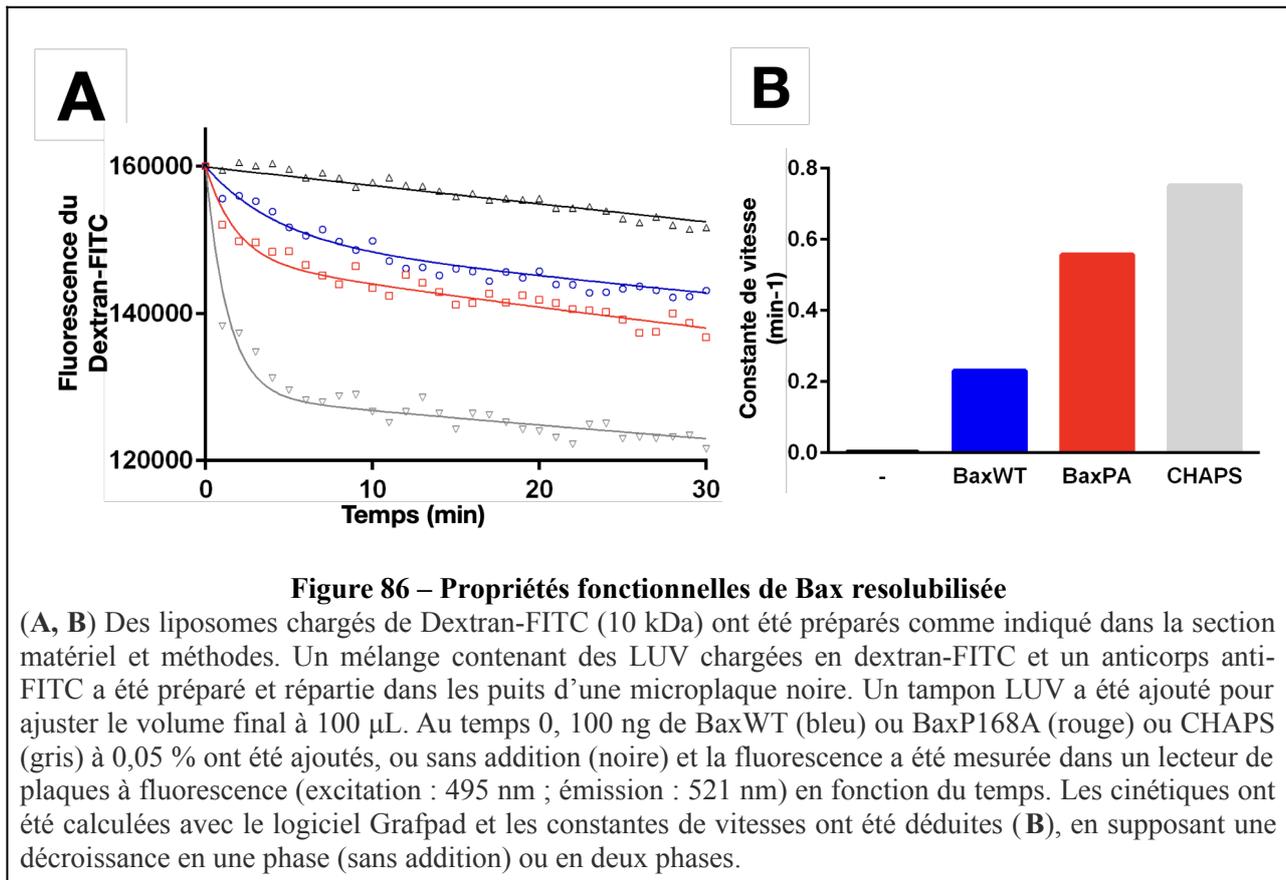
Les deux protéines solubilisées ont généré des spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques de protéines principalement structurées en hélices α (**fig 85A**). Ceci est confirmé par le pourcentage de structures en hélices α calculé avec l'algorithme CDSSTR de Dichroweb, environ 70% pour Bax WT et le mutant P168A (**fig 85B**). De façon intéressante, ces valeurs sont cohérentes avec celles

obtenues par Simonyan et al [165] pour His6-Bax produite en système de synthèse «Cell-free» en présence de 0,01 % Brij-58 ou 0,05 % F8-TAC. De plus ces valeurs sont cohérentes avec les calculs de pourcentages d'hélices α dans la structure résolue par Suzuki et al. (entre 65 et 73%) [118].

3.2. Propriétés fonctionnelles de Bax resolubilisée

L'étape suivante a été d'évaluer la fonctionnalité du Bax resolubilisée. La capacité de Bax à perméabiliser des liposomes (LUV) chargés de Dextran conjugués au FITC, dont la taille (10 kDa) est proche de celle du cytochrome *c* (12,5 kDa) comme décrit par Kuwana et al (2020) [240]. Pour rappel, le principe de cette expérience est basé sur l'utilisation d'un anticorps anti-FITC. Ce dernier, en se liant au FITC, permet d'éteindre sa fluorescence. Ainsi les liposomes chargés de FITC sont illuminés à fréquence et intensité contrôlées afin d'éviter le photo-blanchiment. La fuite de FITC se traduira ainsi par une diminution de la fluorescence en fonction du temps, car ce dernier en sortant de l'espace intra-liposomal voit sa fluorescence éteinte par son anticorps.

Nous avons observé que Bax WT et Bax mutant P168A ont tous deux provoqué une diminution de la fluorescence. Ceci suggère que les deux variants de la protéine induisent une perméabilisation des liposomes (**fig 86**) avec un effet légèrement plus marqué pour le mutant P168A comparé au Bax WT. Un résultat similaire avait été observé par Simonyan et al [165]; Bax WT et mutant P168A produits dans le système "Cell-free" et maintenues solubles perméabilisent des liposomes chargés de petites molécules ANTS/DPX (< 1kDa) avec une légère différence d'activité entre Bax WT et Bax mutant P168A.



À partir de ces données, nous avons conclu que BaxWT et BaxP168A resolubilisées ont toutes deux conservé des propriétés biochimiques similaires à celles des protéines Bax étiquetées His6 qui avaient été auparavant produites dans le système de synthèse «Cell-free» et maintenues solubles dans les travaux de [165]. Ceci suggère que le cycle précipitation/resolubilisation n'a pas modifié significativement les propriétés structurales et fonctionnelles de BaxWT et BaxP168A, et que ces protéines pourraient donc être utilisées dans des tests de reconstitution dans un environnement membranaire.

4. Co-formation des nanodisques contenant Bax

La reconstitution de protéines dans les nanodisques par co-formation est un processus bien décrit dans la littérature [210], [267](pour revues). Le principe consiste à former les nanodisques en présence de protéines généralement en solution dans un détergent. Les protéines en solution se retrouvent ainsi encapsulées dans le nanodisque naissant.

Pour rappel, la formation de nanodisques démarre d'un film lipidique repris dans un tampon supplémenté en détergent dialysable, en l'occurrence le Cholate de Sodium. A ce stade, on obtient des micelles mixtes lipides/détergents. Avant d'incorporer les protéines Bax resolubilisées dans du

Brij-58 à ces micelles mixtes, nous avons retiré l'excès de Brij-58 afin d'éviter un mélange hétérogène de détergents pouvant modifier la forme et/ou la taille des micelles mixtes de départ. Les nanodisques ainsi formés ont été purifiés par chromatographie d'exclusion par la taille sur une colonne de sephadex (Superdex 200 10/300 GL). Dans ces conditions de chromatographie, le volume d'élution des nanodisques est connu, entre 10 et 15mL.

Nous avons observé que le volume d'élution des nanodisques co-formés avec Bax est cohérent avec ce qui a été décrit dans la littérature, entre 10 et 15mL (**fig 87A**). Entre 10 et 12,5mL, on peut observer un épaulement qui est proportionnellement plus important pour les nanodisques co-formés avec Bax P168A, comparé à ceux co-formés avec Bax WT (**fig 87A**).

Nous avons ensuite analysé toutes les fractions issues de la chromatographie d'exclusion par la taille en western blot, révélé contre Bax et la protéine d'échafaudage des nanodisques (His7MSP1E3D1).

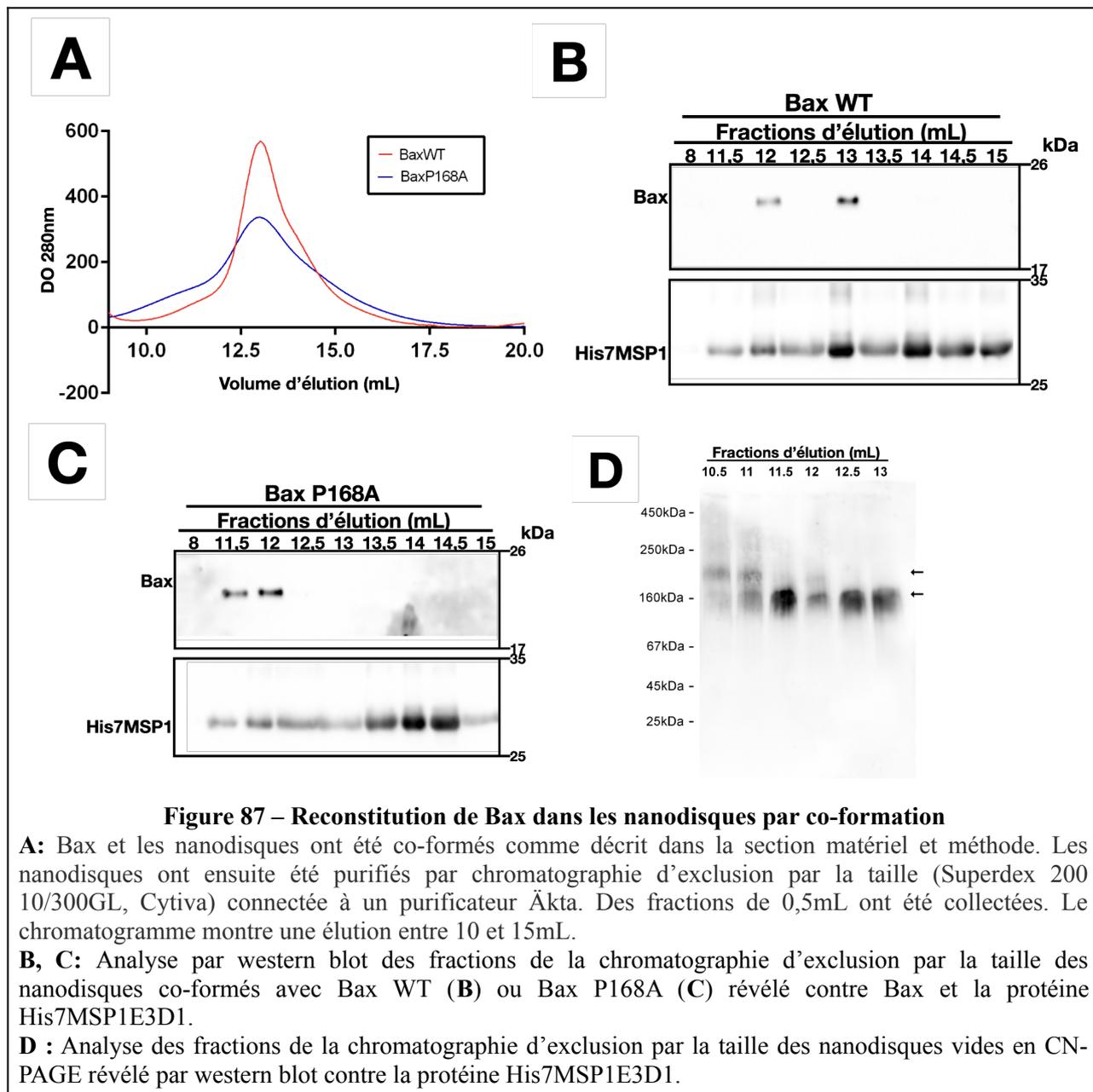


Figure 87 – Reconstitution de Bax dans les nanodisques par co-formation

A: Bax et les nanodisques ont été co-formés comme décrit dans la section matériel et méthode. Les nanodisques ont ensuite été purifiés par chromatographie d'exclusion par la taille (Superdex 200 10/300GL, Cytiva) connectée à un purificateur Äkta. Des fractions de 0,5mL ont été collectées. Le chromatogramme montre une élution entre 10 et 15mL.

B, C: Analyse par western blot des fractions de la chromatographie d'exclusion par la taille des nanodisques co-formés avec Bax WT (**B**) ou Bax P168A (**C**) révélé contre Bax et la protéine His7MSP1E3D1.

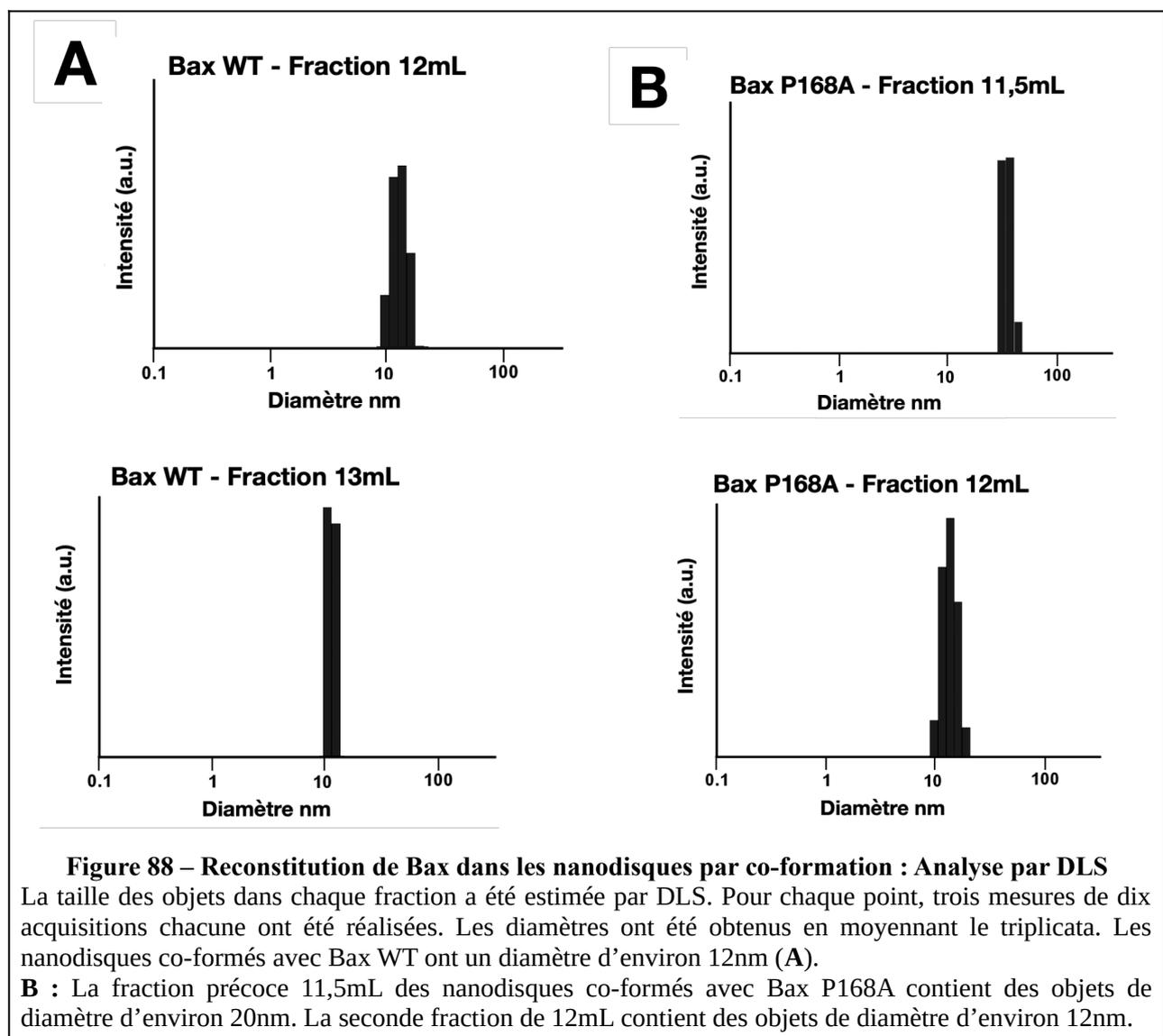
D : Analyse des fractions de la chromatographie d'exclusion par la taille des nanodisques vides en CN-PAGE révélé par western blot contre la protéine His7MSP1E3D1.

Dans les premières fractions de 12 à 13mL, Bax co-localise avec la protéine His7MSP1E3D1, tandis que les fractions plus tardives (13,5 à 15mL) ne contiennent que la protéine His7MSP1E3D1 (**fig 87B et C**). Ceci suggère une séparation entre des nanodisques contenant Bax et des nanodisques vides.

Il est important de noter que deux populations distinctes de nanodisques contenant Bax WT ont été observées (**fig 87B**). Cette observation suggère que ces nanodisques contiennent deux populations distinctes de Bax, que l'on pouvait supposer comme étant Bax monomérique et Bax oligomérique. Cependant, les mesures de DLS ont montré que ces deux populations de nanodisques possèdent des diamètres similaires ($\approx 12\text{nm}$) (**fig 88A**). De plus, comme décrit dans la section matériel et

méthodes, la préparation de nanodisques vides, échafaudés par la protéine HIS7MSP1E3D1, conduit aussi à deux populations distinctes de nanodisques (**fig 87D**). Ceci pourrait expliquer la présence des deux populations de nanodisques contenant Bax WT.

Par contre, Pour BaxP168A, une fraction précoce supplémentaire est apparue (fraction 11,5 mL). Les mesures de DLS ont montré que cette fraction contient des nanodisques beaucoup plus gros en diamètre ($\geq 20\text{nm}$) (**fig 88B**). Néanmoins, la fraction 12 mL contient des objets ayant la même taille que la fraction 12 mL des nanodisques co-formés avec Bax WT (**fig 88A et B**). Ceci suggère que les nanodisques de la fraction 11,5mL contiennent une population de Bax oligomérique, augmentant leur taille.



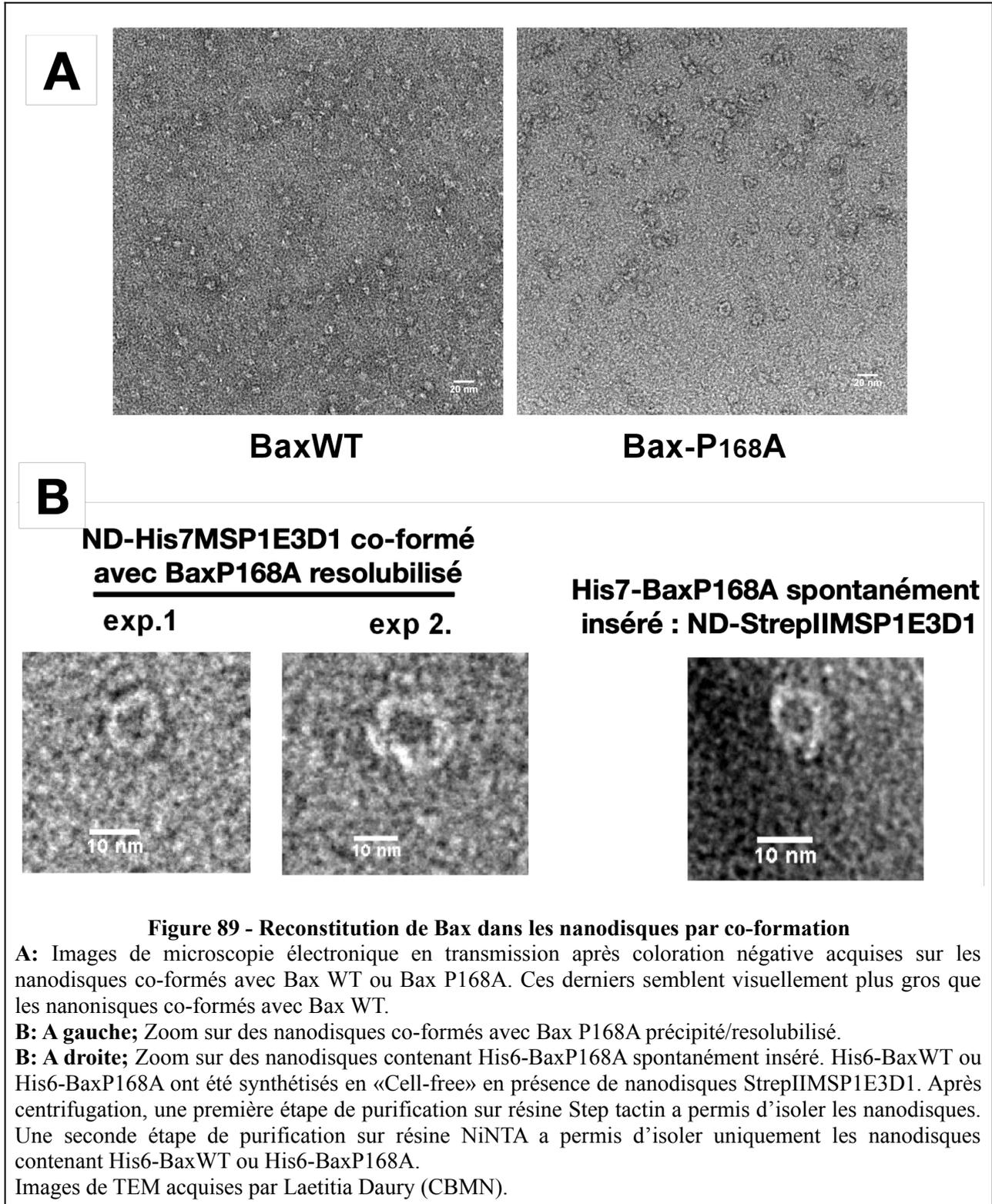
4.1. Observation des nanodisques co-formés avec Bax en microscopie électronique à transmission

Les fractions de nanodisques co-formés où Bax colocalise avec la protéine His7MSP1E3D1 ont été observés en microscopie électronique à transmission (TEM) après coloration négative. Les deux fractions de BaxWT et de BaxP168A contiennent des objets ayant l'apparence et la taille attendue de nanodisques (**fig 89A**).

En réalisant un zoom sur les objets, il est possible d'observer que les nanodisques co-formés avec BaxP168A possèdent des cavités pouvant s'apparenter à un pore au centre (**fig 89B gauche**).

Bien que Bax soit majoritairement précipitée lorsqu'elle est produite en «Cell-free» en présence de nanodisques, une petite partie de la protéine parvient à s'insérer spontanément dans les nanodisques. Nous avons utilisé un système de double purification dans lequel la protéine Bax était étiquetée histidine (His6-BaxWT ou His6-BaxP168A) et la protéine d'échafaudage des nanodisques étiquetée StrepII (StrepIIMSP1E3D1) pour isoler cette fraction minoritaire de la protéine spontanément insérée.

De façon intéressante, l'observation de ces nanodisques StrepIIMSP1E3D1 contenant His6-BaxP168A en microscopie électronique en transmission après coloration négative a montré une similitude avec les nanodisques co-formés avec BaxP168A précipité/resolubilisé (**fig 89B droite**).



Afin de confirmer la présence de pores, des images individuelles de nanodisques ont été manuellement sélectionnées et classées. Les classes 2D montrent plusieurs tailles de disques avec un pore plus ou moins centré ayant une taille ne variant pas plus du simple au double (**fig 90**).

Cependant, l'hétérogénéité des objets ne nous permet pas pour le moment d'envisager des études structurales.

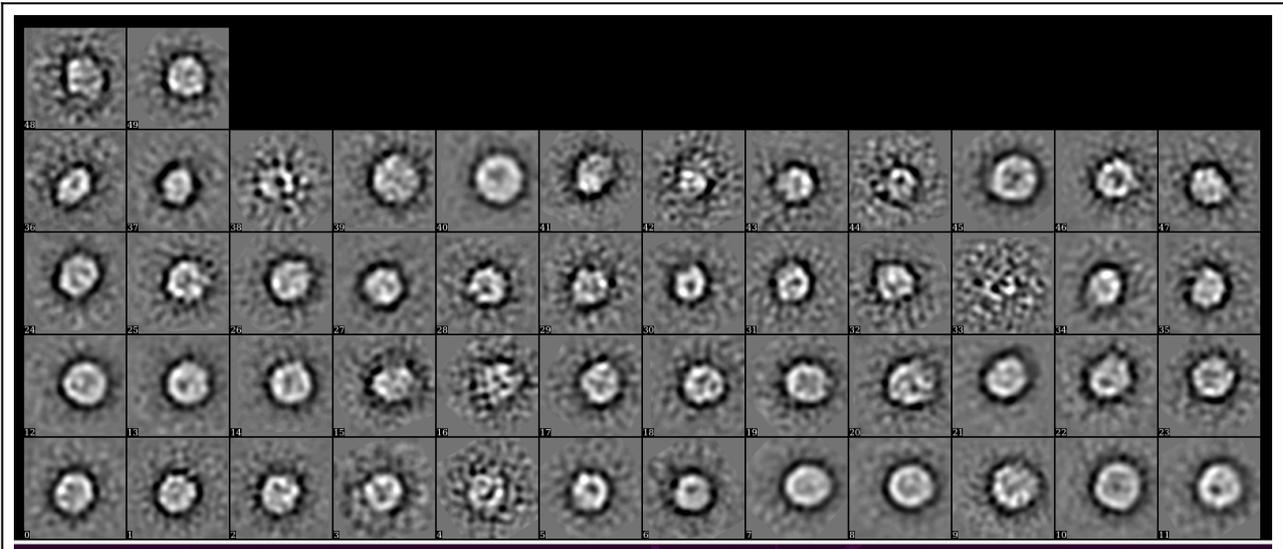
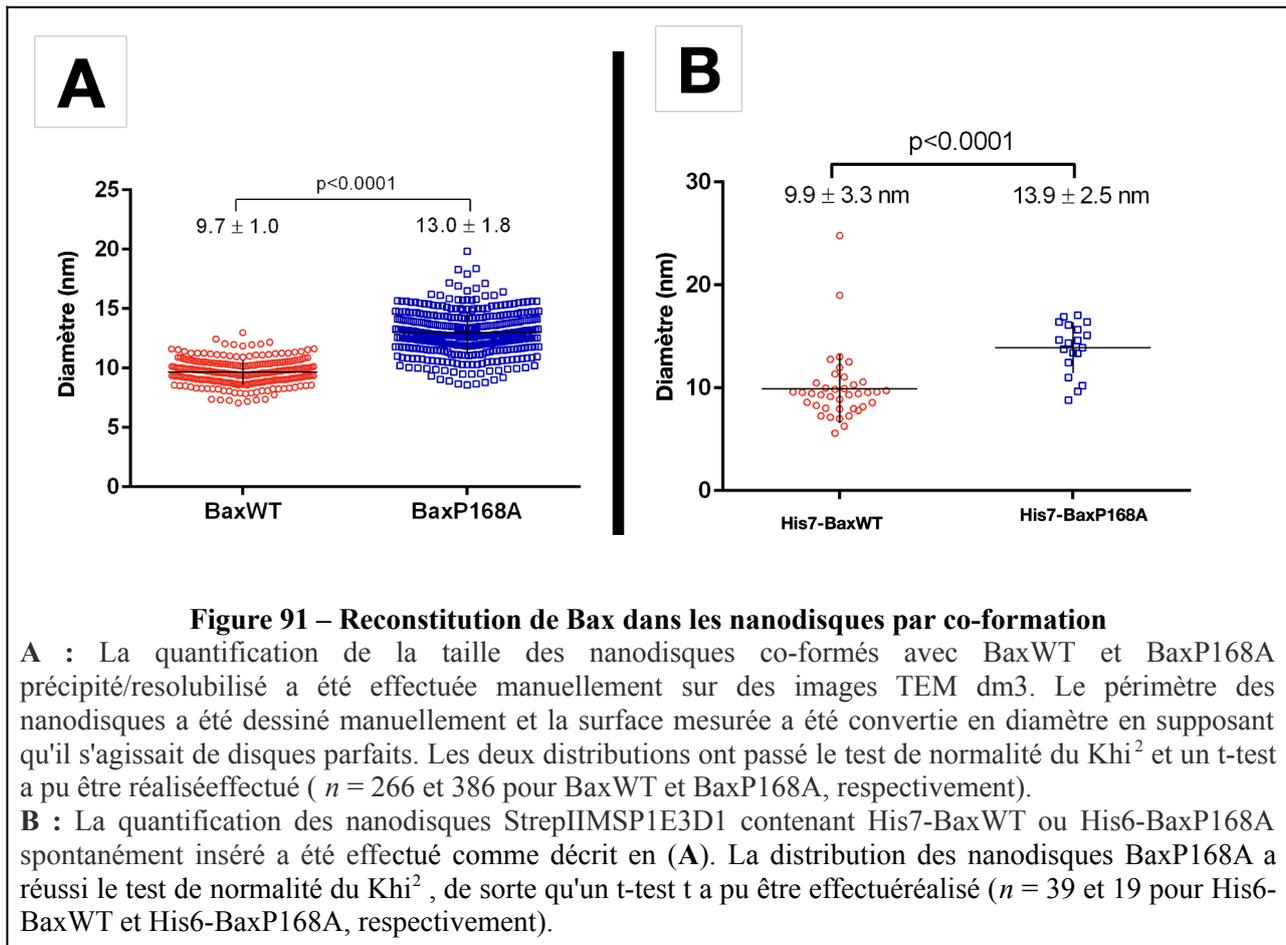


Figure 90 -Classification des nanodisques

Les nanodisques observés dans les expériences de la **figure 89A** (Bax P168A) ont été manuellement sélectionnés, classés et moyennés en 50 classes 2D, dont certaines montrent clairement la présence d'un pore. Images et classification réalisées par Laetitia Daury (CBMN).

La surface des objets a été mesurée et leur diamètre moyen a été calculé (en les considérant comme des disques) (**fig 91A**). Comme prévu à partir des western blots des fractions de chromatographie d'exclusion par la taille, la taille des nanodisques co-formés avec Bax P168A était supérieure à la taille des nanodisques Bax WT. Ceci est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle BaxP168A a tendance à former des oligomères stables qui pourraient générer des contraintes physiques conduisant à des nanodisques significativement plus grands. De plus, les mêmes résultats ont été obtenus pour les nanodisques contenant His6-BaxWT ou His6-BaxP168A spontanément insérés (**fig 91B**).



Nous avons également observé par TEM, les nanodisques contenant Bax WT inséré suite au changement conformationnel induit par TOM22 Δ C ou contenant Bax R9E qui est constitutivement inséré dans les nanodisques (**fig 92**) (voir Partie I, Chapitre II).

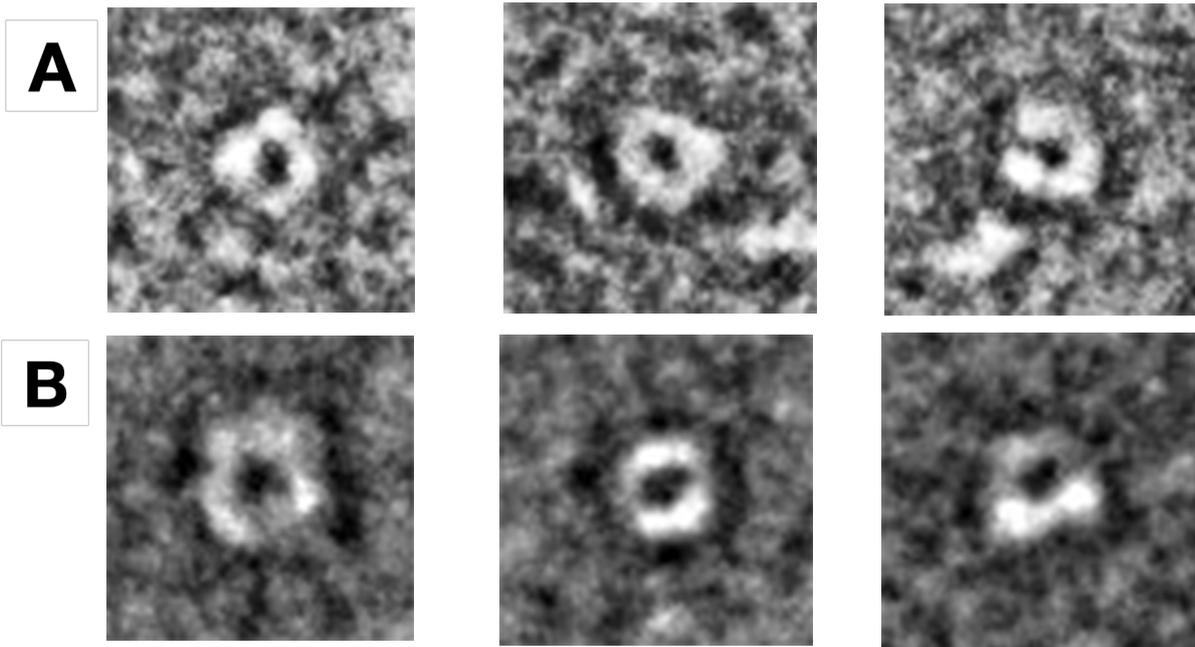


Figure 92 – Images TEM de nanodisques contenant Bax spontanément inséré

A : Nanodisques contenant Bax WT dont l'insertion a été stimulée par TOM22ΔC

B : Nanodisques contenant Bax R9E constitutivement inséré.

Les carrés font 20nm de côté.

Nous avons mesuré manuellement le diamètre des pores. Nous avons observé que les diamètres sont identiques pour Bax WT et Bax R9E (**fig 93**). La taille obtenue (~5nm) est compatible avec celle d'un pore permettant le relargage du cytochrome c (3nm) et correspond aux valeurs déduites des expériences d'électrophysiologie (4,8nm) [189].

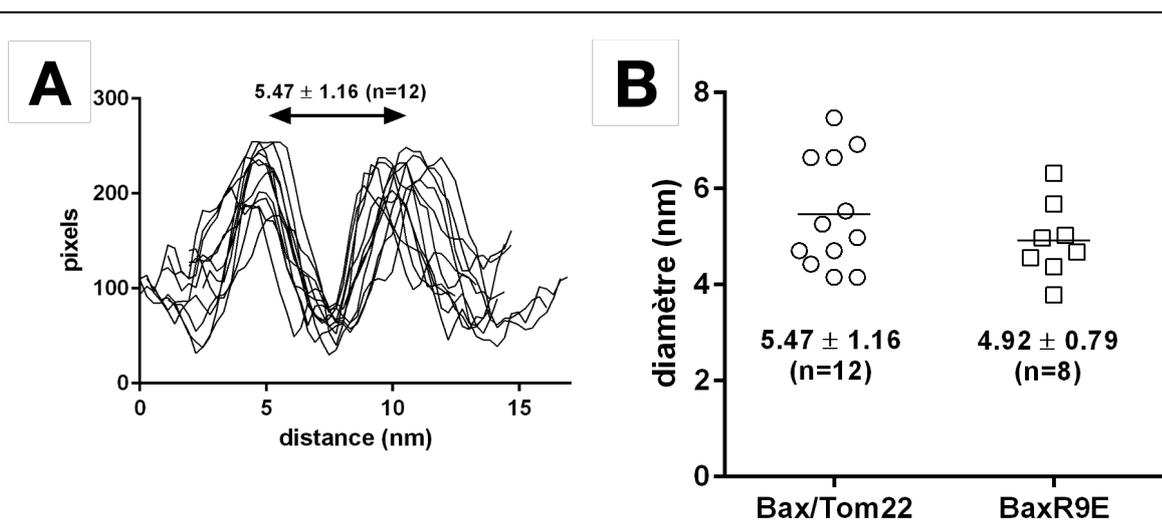


Figure 93 – Mesure de la taille des pores formés par Bax spontanément inséré

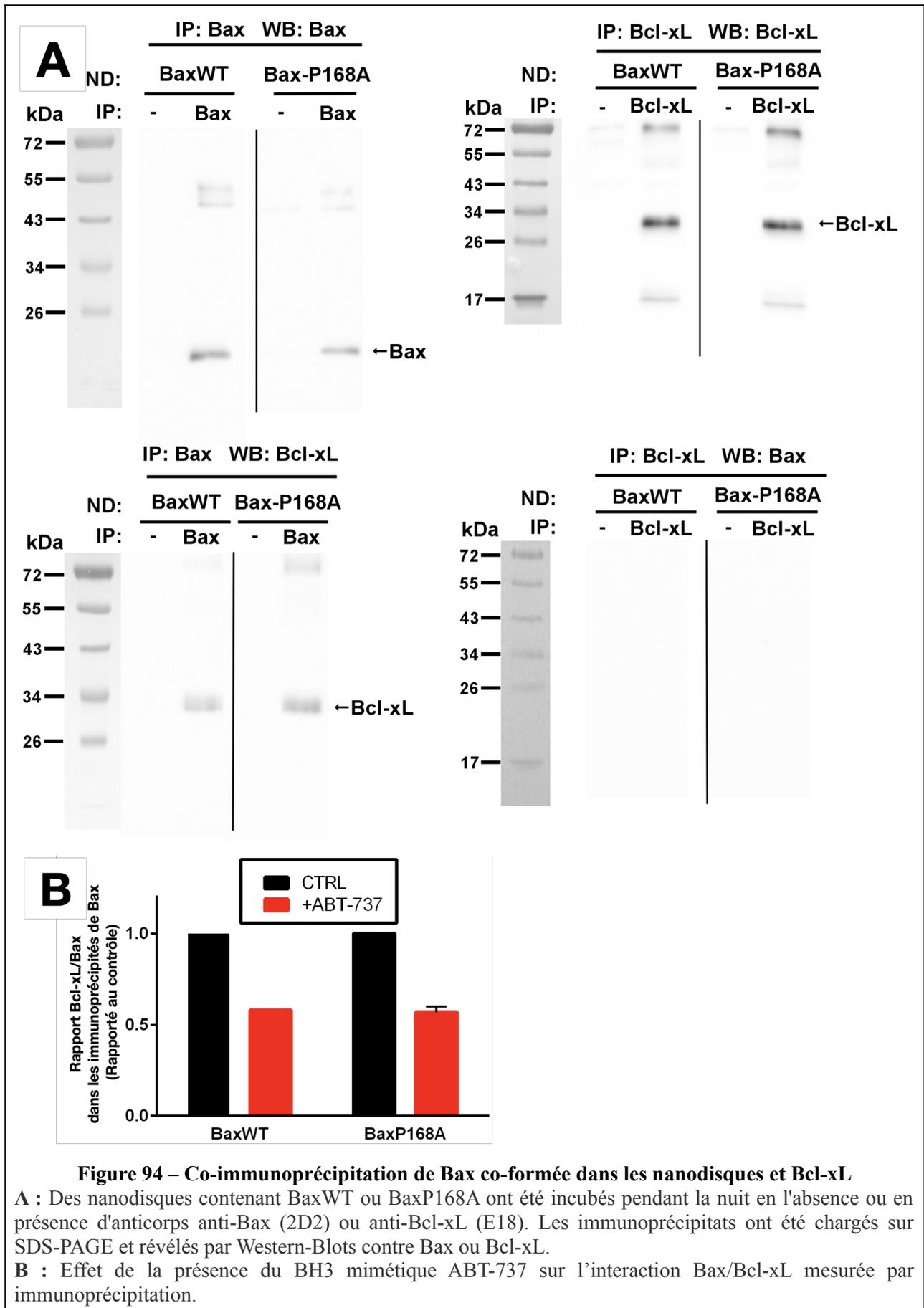
A : Profil densitométrique des nanodisques contenant Bax WT dont l'insertion a été stimulé par TOM22ΔC, mettant en évidence le diamètre du pore.

B : Mesure du diamètre des pores Bax WT et Bax R9E.

4.2. Propriétés fonctionnelles de Bax resolubilisé en nanodisques

Nous avons montré dans le chapitre II de ce travail, que la protéine anti-apoptotique Bcl-xL stimule la translocation et l'insertion de Bax dans les nanodisques. Les deux protéines forment un hétérodimère stable *via* l'insertion de l'hélice α C-terminale de Bcl-xL.

Les propriétés fonctionnelles et conformationnelles de Bax co-formée dans les nanodisques ont été mesurées par sa capacité à interagir avec son partenaire anti-apoptotique Bcl-xL. L'interaction a été mesurée par co-immunoprécipitation.



Nous avons observé que des anticorps dirigés contre Bax ont permis la co-immunoprécipitation de Bcl-xL (**fig 94A gauche**), suggérant que Bcl-xL était capable d'interagir avec Bax reconstitué dans des nanodisques. Il n'y a pas de différence évidente entre Bax^{WT} et Bax^{P168A}. À l'inverse, nous n'avons pas pu immunoprécipiter Bax par des anticorps dirigés contre Bcl-xL, même après une exposition prolongée (**fig 94A droite**). Ces résultats suggèrent que les deux protéines sont toujours capables d'interagir mais que la conformation de Bax dans la bicouche du nanodisque diminue l'affinité entre Bax et Bcl-xL, et compromet la co-immunoprécipitation de Bax par l'anticorps Bcl-xL.

De plus, lorsque la co-immunoprécipitation est réalisée en présence du BH3-mimétique ABT-737, nous avons observé une diminution significative de Bcl-xL immunoprécipitée par des anticorps dirigés contre Bax (fig 94B). En effet, le domaine BH3 de Bax s'insère dans la poche hydrophobe formée par les domaines BH1, BH2 et BH3 de Bcl-xL pour former l'hétérodimère Bax/Bcl-xL [107]. Le fait que la présence de BH3 mimétique connue pour occuper la poche hydrophobe des protéines anti-apoptotiques, dont Bcl-xL, réduise l'interaction Bax/Bcl-xL démontre la spécificité de cette interaction entre Bax co-formée dans les nanodisques et son partenaire anti-apoptotique Bcl-xL.

5. Discussion de la 2ème Partie

La purification de la protéine Bax a longtemps été une étape limitant l'acquisition de données structurales sur la protéine. En comparant les rendements de purification obtenus par Montessuit et al 1999 [264] pour Bax pleine longueur à ceux obtenus par Lewis et al 1998 [265] pour Bax Δ C (Bax dépourvue de son hélice α 9 C-terminale transmembranaire) il apparaît que les problèmes liés aux rendements de purification de Bax dans *E. Coli* soient dus à la présence de l'hélice α 9 C-terminale. En effet la quantité de protéines brutes obtenues dans les deux études est sensiblement égale (**fig 95**). Cependant, le rendement obtenu pour Bax Δ C (53%) après deux étapes de purification est considérablement supérieur à celui obtenu pour Bax pleine longueur (11%) (**fig 95**). Ceci suggère un problème de solubilité de la protéine pleine longueur, dû partiellement à son hélice α 9, car le retrait de cette dernière permet d'améliorer le rendement. Le système de synthèse «Cell-free» offre l'avantage de produire les protéines membranaires en présence d'agents mimant un environnement membranaire (liposomes, nanodisques) ou d'agent de solubilisation (détergents, surfactants).

A

Purification step	Total protein (mg)	Bax (mg)	Yield (%)
Crude supernatant	12,036	115	100
Nickel–NTA–agarose	60	54	47
Q–Sepharose	13	13	11

B

Purification step	Total protein (mg)	Bax _{ΔC} (mg)	Yield (%)
Crude supernatant	13,870	137 ^a	100
Glutathione–Sepharose	122	88	64
Heparin–Sepharose	112	87	64
DEAE–Sepharose	72	72	53

Figure 95 – Rendement de purification de Bax humaine pleine longueur et Bax_{ΔC} à partir de 100 g de cellule d'*E. Coli*

A : purification de Bax pleine longueur étiquetée His6 à partir de 100g de cellules d'*E. Coli*. Le rendement après deux étapes de purifications est de 11% [264].

B : purification de Bax_{ΔC} étiquetée GST à partir de 100g de cellules d'*E. Coli*. Le rendement après trois étapes de purifications est de 53% [265].

Le système de synthèse «Cell-free» pour améliorer le rendement de purification de Bax a été décrit par Simonyan et al [165]. Cependant, même si la synthèse «Cell-free» permet de s'affranchir des problèmes de rendement, Bax a été purifiée avec une étiquette histidine en N-terminal.

Nous avons montré dans le chapitre I qu'une régulation importante de l'activation de Bax est liée au mouvement d'un domaine non structuré de son extrémité N-terminale. En effet, il a été montré que la délétion des 20 résidus N-terminaux de Bax génère une protéine ayant une bien plus grande capacité à se lier aux mitochondries et à perméabiliser la MOM, aussi bien dans les cellules de levure que dans les cellules humaines [142], et à induire l'apoptose des cellules humaines [142], [156]. Ce domaine a été nommé ART (Apoptotic Regulation of Targeting) [150]. Fait intéressant, une variante d'épissage similaire (appelée Bax^Ψ) a été trouvée dans les glioblastomes de bas grade montrant un taux d'apoptose plus élevé [151]. Pour rappel, Arokium et al ont observé qu'un résidu dans cette partie de la protéine, l'arginine 9 (R9), jouait un rôle important dans la modulation de la translocation de cette dernière vers la MOM [157]. En effet, ce résidu R9 pourrait interagir avec le résidu aspartate 154 (D154) situé dans la boucle entre les hélices $\alpha 7$ et $\alpha 8$: l'inversion d'une de ces charges (E9 ou K154) induit l'activation de Bax, alors qu'un mutant portant une double inversion (E9/K154) a la même activité que la protéine sauvage (R9/D154). La présence de charges du côté N-terminal de Bax peut alors avoir une influence majeure sur les changements conformationnels liés à l'ART. La présence d'une étiquette Histidine (His6) chargée positivement à l'extrémité N-terminale pourrait donc potentiellement interférer avec l'activation de Bax. De plus, nous avons démontré dans les chapitres précédents que l'insertion de Bax étant conduite par son hélice $\alpha 9$ transmembranaire C-terminale, la présence d'une étiquette à cette extrémité pourrait également

compromettre l'insertion membranaire de la protéine [268]. Il est donc souhaitable de produire la protéine sans étiquette.

En plus de résoudre le problème de rendement, notre étude offre donc l'avantage supplémentaire de purifier Bax sans aucune étiquette, ce qui évite les étapes de clivage d'étiquettes qui laissent dans la majorité des cas des résidus additionnels.

Il est important de rappeler que la précipitation de Bax ne survient qu'en présence de nanodisques suite à un changement conformationnel. Cette précipitation est donc différente d'une agrégation protéique qui implique un mauvais repliement. Nous avons montré que la précipitation de Bax n'implique que le domaine «GALLL»; l'hélice α_9 , qui est une hélice hydrophobe, reste stabilisée dans la poche hydrophobe pendant cette précipitation. Bax précipitée conserverait ainsi une grande partie de sa conformation initiale. Pour preuve, les données de dichroïsme circulaire ont montré que

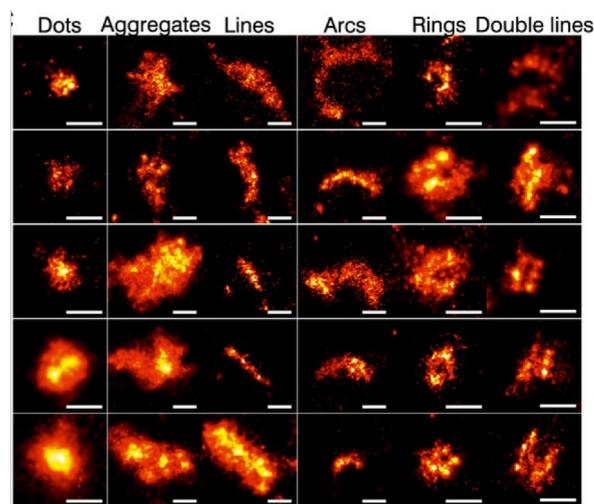


Figure 96 : les différentes organisations supramoléculaire de Bax dans la MOM des cellules HeLa en apoptose. Observation en microscopie de super résolution [262].

Bax précipitée puis resolubilisée était comparable en terme de structures secondaires au His6-Bax produit en «Cell-free» en présence d'un détergent ou d'un surfactant polyfluoré, et donc maintenue soluble sans jamais être précipitée [165].

À l'instar des liposomes, les nanodisques forment un environnement se rapprochant de l'environnement natif des protéines membranaires. En plus d'être plus stable que les liposomes, ils présentent l'avantage d'être encerclés par la protéine d'échafaudage MSP. Celle-ci permet non seulement de purifier les nanodisques, mais également de leur imposer une limite de taille. L'une des principales limites à l'obtention de données structurales sur Bax oligomérique dans un environnement membranaire est liée aux différents états d'oligomérisation de la protéine dans la membrane. Ceci crée une hétérogénéité limitante pour l'obtention de données structurales

cohérentes. Par exemple, une étude utilisant la microscopie de localisation de molécule unique (SMLM) a permis de mettre en évidence la structure supramoléculaire des assemblages d'oligomères de Bax active dans la (MOM) [262]. Dans cette étude, des cellules HeLa ont été transfectées avec GFP-Bax WT. Des images de super résolution ont été acquises après déclenchement de l'apoptose. Ces images montrent que GFP-Bax forme dans la MOM des structures hétérogènes (lignes, arcs, anneaux complets et incomplets) (**fig 96**).

Nous nous sommes demandés si cette hétérogénéité dans l'assemblage des structures supramoléculaires de Bax pourrait être réduite en utilisant les nanodisques comme modèle membranaire. Les nanodisques étant contraints par leur encerclement par la protéine MSP, on peut supposer que l'insertion et l'oligomérisation de Bax soient conditionnées par la contrainte de taille, et donc d'espace, imposée par les nanodisques. C'est dans cette optique que nous avons couplé la synthèse «Cell-free» et la présence de nanodisques pour reconstituer la protéine dans un environnement membranaire en même temps qu'elle était traduite, comme cela a été fait pour d'autres protéines membranaires [269], [270]. Cependant, l'insertion de Bax dans les nanodisques n'étant pas spontanée, nous avons dû reconstituer Bax dans les nanodisques par co-formation, selon la méthode utilisée classiquement.

L'insertion spontanée d'une protéine dans les nanodisques dépend à la fois des propriétés intrinsèque de la protéines et des contraintes imposées par les nanodisques. A l'inverse, la co-formation permet une reconstitution de la protéine qui ne dépend que des contraintes imposées par l'environnement membranaire des nanodisques. Pour reconstituer une protéine membranaire dans les nanodisques par co-formation, ces dernières doivent nécessairement être intégrées à la micelle mixte lipides/détergents servant de base pour la formation des nanodisques. A mesure que les détergents sont retirés, les phospholipides s'organisent en bicouche dont les zones hydrophobes sont stabilisées par la protéine MSP. Les protéines d'intérêt initialement présentes dans la micelle mixte se retrouvent ainsi intégrées dans les nanodisques naissants. Théoriquement, cette méthode permet d'intégrer dans les nanodisques les protéines se trouvant dans la micelle mixte de départ. Dans notre expérience de co-formation, nous avons observé que les nanodisques co-formés avec le mutant Bax P168A avaient une taille supérieure à ceux co-formés avec Bax WT. Cette différence de taille entre les deux types de nanodisques pourrait indiquer que, dans les nanodisques co-formés avec Bax P168A, cette dernière est organisée en structures de plus grande taille (oligomères) qui contraignent les nanodisques à s'adapter à la taille de l'objet à intégrer. Il est à noter que plusieurs études ont mis en évidence le caractère flexible des nanodisques. En effet, des mesures par SAXS montrent que les nanodisques peuvent également adopter des formes elliptiques [271]. Dans un autre exemple, les nanodisques ayant inséré de la bactériorhodopsine adoptent une forme carrée [272].

Nous avons par la suite confirmé en microscopie électronique en transmission après coloration négative, qu'une partie des nanodisques co-formés avec Bax P168A possédaient des pores dont la circonférence semblait être délimitée par Bax (**fig fig 90 classes 11, 30, 31**). Ce résultat suggère que Bax P168A était déjà organisée en oligomère dans la micelle mixte lipides/détergents qui est la base de la formation de ces nanodisques. Ceci est cohérent avec les résultats de marquage au NEM-PEG de l'hélice $\alpha 9$ du mutant Bax P168A.

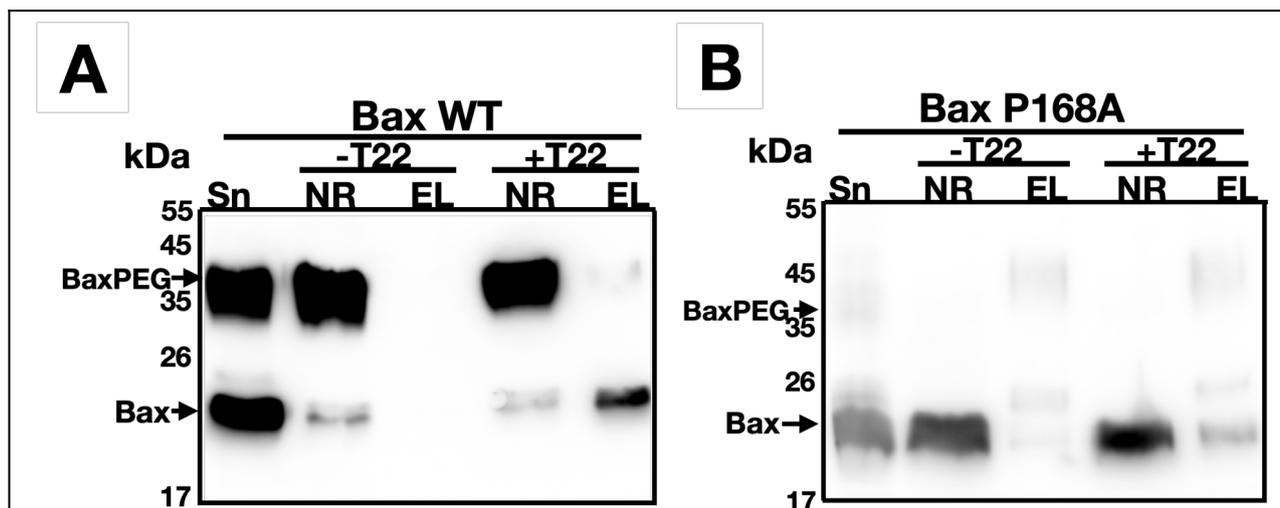


Figure 97– Mesure de l'insertion de l'hélice $\alpha 9$ de Bax

A et B: Bax-C62S-C126S-V177C (BaxWT) et Bax-C62S-C126S-P168A-V177C (BaxP168A) ont été synthétisées en système «Cell-free» en absence ou en présence de MOM-ND-His7 (ND) ou co-synthétisées avec TOM22 en présence de ND. Les milieux réactionnels (RM) de synthèse ont été centrifugés. Les fractions surnageants (Sn) des conditions de production en présence de nanodisques (avec ou sans TOM22) ont été chargées sur résine NiNTA. Deux fractions non-retenus (NR) et éluats (EL) ont été obtenues. Ces deux fractions ainsi que la fraction surnageant (Sn) de conditions de production en absence de ND ont été incubées avec 0,2mM de NEM-PEG pendant 1minute. La réaction a été arrêté avec du NEM. Les fractions ont été analysées par western blot révéler contre Bax.

Nous avons observé que, pour Bax WT, la cystéine en position 177 dans l'hélice $\alpha 9$ est marquée lorsque Bax est en solution mais non marquée lorsqu'elle est insérée dans les nanodisques *via* le changement conformationnel induit par TOM22 (**fig 97A**). *A contrario*, pour Bax P168A, cette cystéine n'est pas marquée, que la protéine soit en solution ou insérée dans les nanodisques (**fig 97B**). Cette protection de la cystéine contre le marquage peut s'expliquer par le fait que, dans le mutant P168A, l'hélice $\alpha 9$ n'est plus stabilisée dans la poche hydrophobe; étant une hélice majoritairement hydrophobe, il est donc envisageable que les hélices $\alpha 9$ se stabilisent entre elles formant ainsi des dimères, voire même des oligomères. La présence de ces oligomères dans les nanodisques expliquerait la différence de taille observée entre les nanodisques co-formés avec Bax WT et ceux co-formés avec Bax P168A.

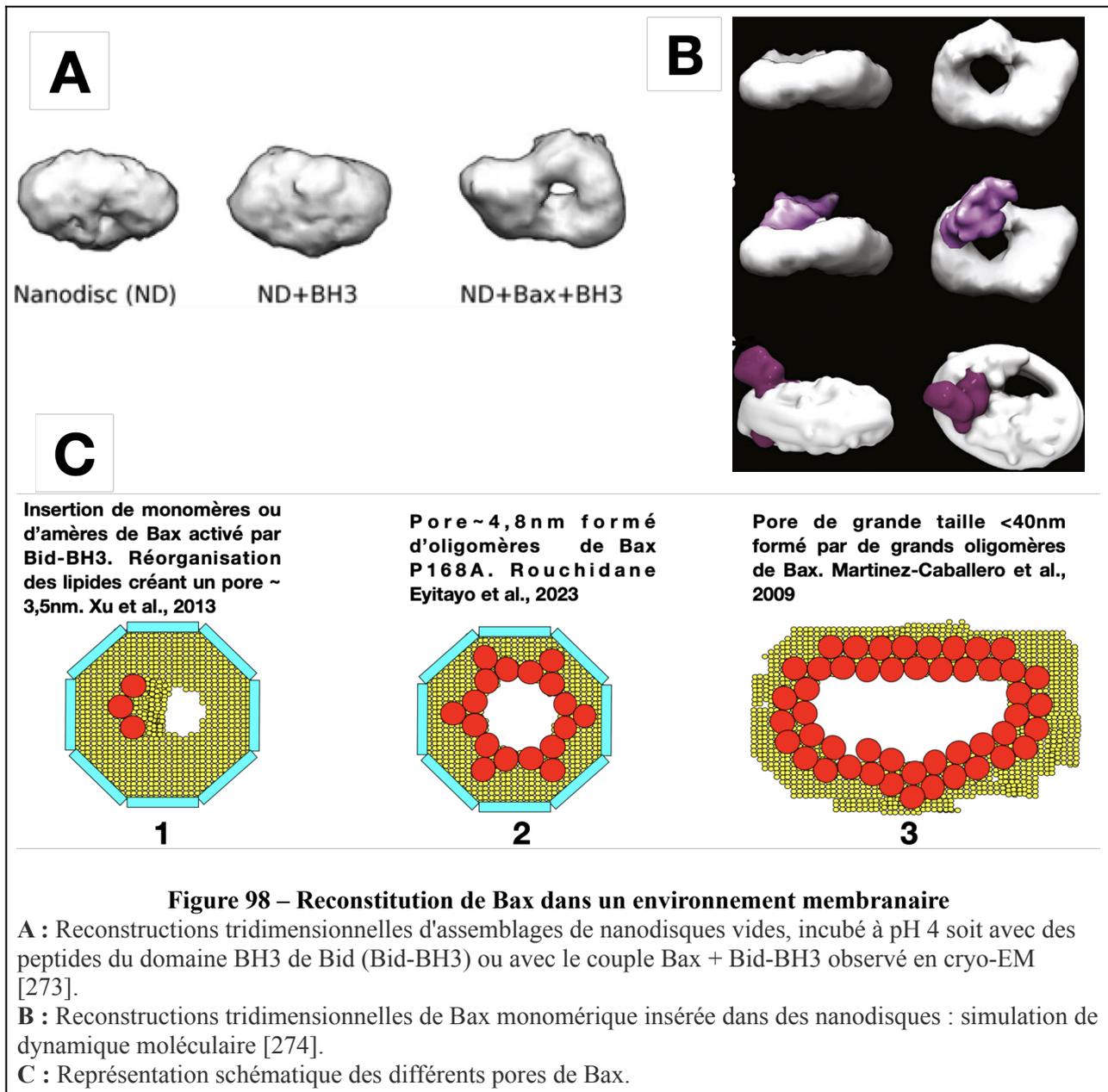
On peut noter cependant que les nanodisques co-formés avec Bax P168A qui ne semblent pas contenir un pore bien défini (**fig 90, classes 7, 8, 39**) présentent malgré tout une taille supérieure aux nanodisques co-formés avec Bax WT. Ceci pourrait être expliqué par une co-formation de multiples dimères de Bax P168A conduisant à l'augmentation de la taille des nanodisques.

La différence de surface entre les nanodisques co-formés avec Bax P168A et ceux co-formés avec Bax WT est d'environ 58nm^2 (en considérant qu'il s'agit de disques parfaits). Le diamètre moyen d'une hélice α est d'environ 1,2nm. En supposant un modèle dans lequel 3 hélices sont insérées ($\alpha 5$, $\alpha 6$ et $\alpha 9$) et où les oligomères de Bax sont formés de 12 monomères [117], les hélices insérées occuperaient une surface d'environ 40nm^2 . Cela donnerait une surface d'environ 18nm^2 pour le pore (environ 4,8nm de diamètre), ce qui est cohérent avec la taille attendue calculée à partir d'expériences d'électrophysiologie : en effet, le pore de Bax est perméable au cytochrome c (~ 3 nm de diamètre), à la ribonucléase A (~ 3,5 nm de diamètre), mais pas à l'hémoglobine (~ 5 nm de diamètre) [189].

De façon intéressante, nous avons mesuré le diamètre des pores formés par Bax insérée spontanément suite au changement conformationnel induit par TOM22 Δ C ou par la mutation R9E, et déterminé une valeur d'environ 5nm (**fig 93**). Avec des approches expérimentales et des calculs différents, les valeurs obtenues pour le diamètre des pores sont similaires entre elles et à celles déterminées par les expériences d'électrophysiologie.

Une étude réalisée précédemment a rapporté la reconstitution de Bax dans des nanodisques [273]. Dans cette étude, où Bax portait une étiquette histidine en N-terminal (His6-Bax), l'insertion de Bax dans les nanodisques a été stimulée suite à son activation par le peptide BH3 de Bid dans un tampon à pH 4. Leurs observations en cryo-EM ont montré que la taille et la forme des nanodisques contenant Bax étaient différentes de celles des nanodisques vides, avec une forme plus ellipsoïdale et la présence d'un pore d'un diamètre de 3,5 nm (**fig 98A**). Les auteurs ont supposé que Bax était inséré sous forme de monomère dans les nanodisques. Cependant, il a été démontré plus tard que le traitement de Bax par un peptide Bid-BH3 utilisé dans cette étude induisait la formation, *a minima*, de dimères de Bax [179]. De plus, des simulations de dynamique moléculaire de Bax insérée dans des nanodisques ont prédit que l'ajout d'une seule protéine Bax dans la bicouche lipidique serait suffisant pour déclencher la formation d'un pore, en réorganisant les molécules lipidiques dans le nanodisque à proximité immédiate de Bax, formant ainsi un espace vide comme effet secondaire (**fig 98B**) [274]. Ainsi le pore formé par Bax monomérique dans les nanodisques serait de nature lipidique. En s'insérant, Bax provoquerait un réarrangement de lipides autour de ces hélices

insérées créant ainsi un espace vide (3nm de diamètre) (**fig 98C «1»**). Cette hypothèse d'un pore de nature lipidique, ou de la participation active de certains lipides à la formation du pore, est également soutenue par d'autres observations, montrant l'implication des cardiolipides [275] [276], ou des céramides [277]. Cependant, la conclusion selon laquelle un monomère, voire un dimère, de Bax est suffisant pour former un pore ayant une taille permettant pour perméabiliser une membrane au cytochrome c n'est pas conforme aux expériences d'électrophysiologie, dans lesquelles la formation d'oligomères de Bax est nécessaire pour former le pore [189].



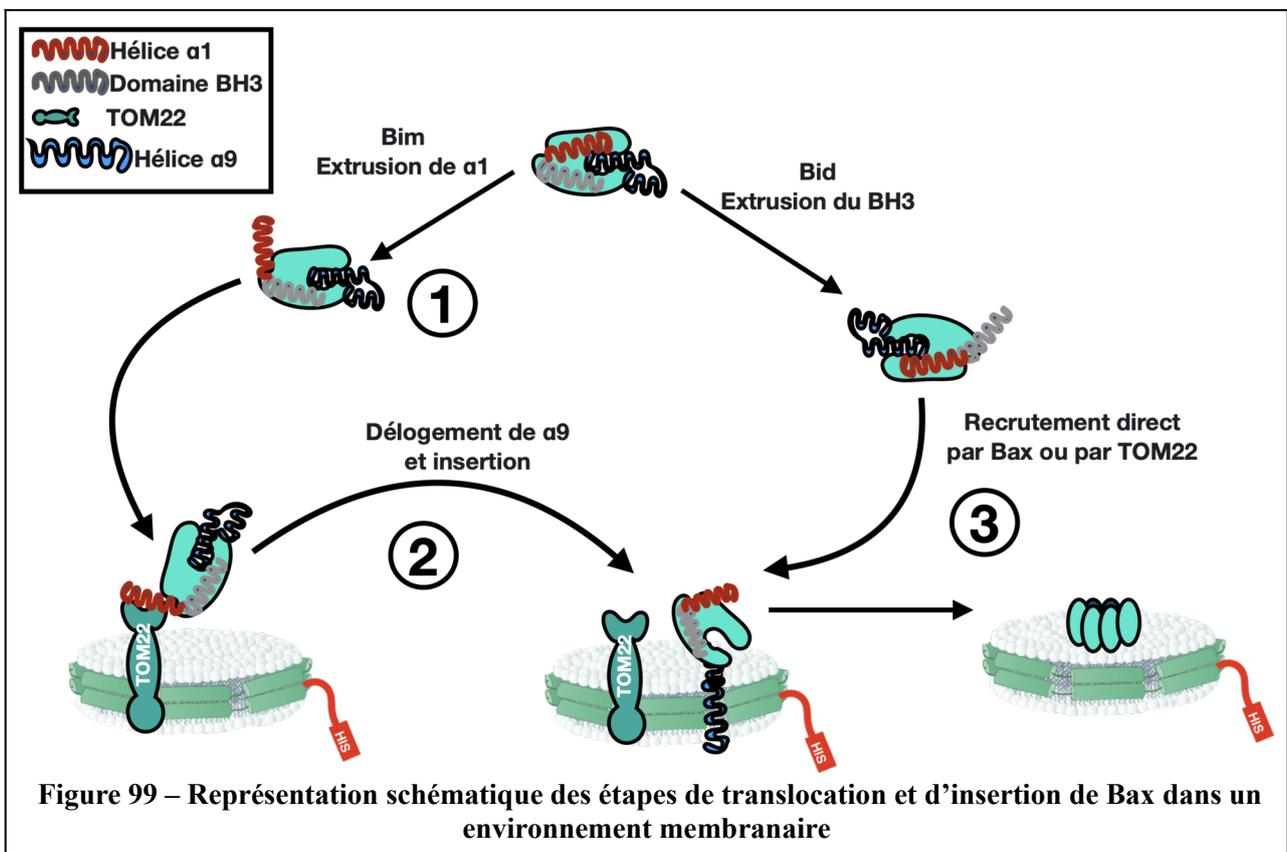
A contrario, le pore formé dans les nanodisques co-formés avec Bax P168A ou ceux observés suite à l'insertion spontanée de Bax WT ou Bax R9E, est un pore protéique dont la circonférence est délimitée par Bax (~5 nm de diamètre) (**fig 98C «2»**).

Comme l'ont montré Große et al et Salvador-Gallego et al, Bax peut former des pores de très grandes taille (>40nm) dans des cellules apoptotiques. Des études de microscopie à force atomique ont confirmées que Bax peut former de telles structures dans des bicouches (**fig 98C «3»**) [262] [263]. Ces résultats semblent peu compatibles avec les données d'électrophysiologie montrant que le pore formé par les oligomères de Bax ne laisse passer que des protéines ayant une taille inférieure à 5nm [189]. Des pores ayant une taille similaire avaient été mis en évidence sur des MOM d'hépatocytes de rats soumis à une hépatite fulminante liée au déclenchement de l'apoptose [278]. Même si les pores que nous avons mis en évidence dans les nanodisques de Bax sont *a priori* plus grands que le pore formé par activation de Bax par le peptide BH3 de Bid [273], il reste beaucoup plus petit que les gros objets formant des anneaux ayant un diamètre de plusieurs dizaines de nanomètres qui ont été observés par microscopie à force atomique. Ces gros objets pourraient correspondre à des étapes tardives de l'apoptose, lorsque plusieurs molécules de Bax se rassemblent pour former de grands trous non sélectifs dans la MOM, comme décrit par Martinez-Caballero et al (2009) [193], tandis que les « petits » pores pourraient correspondre aux premières étapes de l'apoptose, lorsque la perméabilisation est limitée à certains facteurs apoptogènes, à savoir le cytochrome c et smac/diablo [279].

Les données les plus récentes montrent que la perméabilisation de la MOM par Bax et Bak peut se faire à différents niveaux conduisant à différents processus, depuis la réponse inflammatoire jusqu'à l'apoptose et à la nécroptose. Chacun de ces processus pourrait être associé à des états différents de formation des pores Bax/Bak [280], [281], [282]. Ceci semble cohérent avec les hypothèses décrites dans **la figure 98C**.

Conclusion générale et perspectives

Bien que Bax soit la protéine pro-apoptotique à multidomaines BH la plus étudiée, les mécanismes qui sous-tendent sa translocation et son insertion dans la MOM restent mal compris. Les deux modes d'activation connus de la protéine font état d'un unique changement conformationnel induit par les protéines à BH3 seulement [220] (pour revue). L'une des principales problématiques dans la littérature est de comprendre comment l'hélice $\alpha 9$ de Bax est délogée du sillon hydrophobe [198] (pour revue). Suzuki et al ont observé que la configuration de cette hélice dans le sillon est telle que son déplacement par une protéine à BH3 seulement par compétition de fixation dans le sillon serait impossible sans apport d'énergie [118]. D'autre part il a été montré que Bim active Bax en se fixant dans une zone "non canonique" à l'opposé du sillon hydrophobe [283]. Cependant le changement conformationnel induit par Bim n'implique pas directement le délogement de l'hélice $\alpha 9$ [154].



Au vu des données de la littérature et de celles obtenues dans ce travail, nous proposons l'hypothèse selon laquelle la translocation et l'insertion de Bax dans la MOM se font en deux étapes principales (fig 99) :

-La première étape consisterait à extruder le domaine d'interaction de Bax avec TOM22 (domaine "GALLL" de l'hélice $\alpha 1$) et entraînerait par la même occasion, la localisation mitochondriale de Bax

soluble. Cette étape pourrait être réalisée par les protéines à BH3 seulement activatrices telles que Bim.

-La seconde étape consiste à déloger l'hélice $\alpha 9$ de Bax du sillon hydrophobe dans une conformation propice à son insertion dans la bicouche. Il est important que cette étape soit réalisée à l'interface de la MOM ce qui justifierait pourquoi Bax perméabilise sélectivement cette dernière au cours de l'apoptose. Cette étape pourrait être réalisée par TOM22.

Notre modèle ne nous a pas permis de préciser le mode d'action de cBid. Notons néanmoins, qu'une troisième étape d'accélération de l'oligomérisation de Bax par cBid pourrait être envisagée. En effet, Czabotar et al ont montré que la liaison du peptide BidBH3 sur Bax Δ C permet l'extrusion de son domaine BH3, créant ainsi une interface de dimérisation [179].

Le rôle de l'ART dans la régulation de la translocation de Bax dans la MOM a été l'objet de plusieurs études [150] [151] [156]. Arokium et al ont montré qu'en modifiant la conformation de ce domaine, Bax acquiert une conformation entraînant sa localisation constitutive à la MOM chez la levure [157]. Dans notre système *in vitro*, seul le mutant Bax R9E est constitutivement inséré dans les nanodisques. Nous avons montré que ce mutant récapitule le changement conformationnel de Bax induit par TOM22.

Même si le résidu D154 n'est pas situé dans l'ART, Arokium et al ont montré que ce résidu était impliqué dans la stabilité d'une conformation de l'ART. Ils ont observé que le mutant Bax D154K était constitutivement mitochondrial et actif dans la levure [157]. Nos données ont montré que ce résidu est impliqué dans le changement conformationnel de Bax induit par TOM22. De plus nous avons montré qu'une autre mutation dans l'ART, Bax S16A perd la capacité à interagir avec TOM22 et donc à subir le changement conformationnel; pourtant, l'ART n'est pas un domaine d'interaction avec TOM22.

Prises ensemble, nos données montrent que la conformation qu'adopte l'ART de Bax régule sa capacité à s'insérer dans la bicouche lipidique, soit directement, soit via un changement conformationnel.

Nous envisageons d'exprimer ces mutants dans des cellules de mammifères afin de déterminer les effets des partenaires de Bax sur sa capacité à induire l'apoptose lorsque son ART adopte telle ou telle conformation.

Bien que nos données montrent que TOM22 est nécessaire et suffisant pour que Bax acquiert une conformation propice à son insertion sous forme active, l'interaction Bax/TOM22 est dépendante de

l'exposition de son domaine "GALLL" qui s'opère suite à son interaction avec la bicouche lipidique. Nous pensons que les protéines à BH3 seulement activatrices coopèrent avec TOM22 pour la pleine activation de Bax. Afin de mettre en évidence la séquentialité de ces événements, nous allons développer un protocole d'expression de Bax couplé au "silencing" partiel de TOM22 dans des lignées cellulaires soumises à des stimuli apoptotiques impliquant soit Bim, soit Bid.

De plus les effets de TOM22 semblent avoir une pertinence pathophysiologique, car certaines mutations de TOM22 trouvées dans les cancers entraînent une perte de fonction activatrice de Bax. De plus, l'action de TOM22 est nécessaire même après celle des BH3 mimétiques, suggérant une potentialisation des effets de ces molécules par TOM22.

Nous envisageons de déterminer à l'aide de "peptide scanning" les domaines de TOM22 impliqués dans l'interaction avec Bax. Dans un premier temps, nous allons tester leur capacité à se lier au domaine "GALLL" et à promouvoir l'insertion de Bax dans notre système *in vitro*. Puis nous testerons ces peptides dans un contexte de cellules saines et de cellules cancéreuses.

Une autre approche plus directe que celle des peptides «TOM22 mimétiques» pour activer Bax, est de mimer la conformation de la mutation R9E. En effet, tout comme Bax Ψ est plus efficace que Bax WT pour la suppression de tumeurs, nous pensons que Bax R9E pourrait être plus efficace que Bax WT et Bax Ψ pour la suppression de tumeurs en ce sens que son activation n'est pas dépendante de TOM22. IL est donc de ce fait intéressant d'étudier la conformation de l'ART dans Bax R9E par RMN par exemple. Nous pourrions ainsi utiliser notre système *in vitro* pour faire un "screening" de molécules permettant d'adopter cette conformation. Une approche similaire a déjà été utilisée avec succès pour identifier des molécules conférant à l'hélice $\alpha 9$ une conformation empêchant sa phosphorylation par la kinase AKT [161].

L'un des défis majeurs dans l'acquisition des données structurales sur des oligomères de Bax dans un environnement membranaire est l'hétérogénéité importante des structures supramoléculaires. La configuration des nanodisques permet de restreindre l'espace disponible et donc de limiter le nombre de molécules de Bax pouvant s'insérer. Cependant, nous avons montré que les nanodisques formés avec la His7-MSP1E3D1 sont polydisperses. Récemment des études ont montré que la circularisation covalente de la MSP permettait d'éliminer cette polydispersité [284]. Nous envisageons de combiner la synthèse de Bax R9E ou Bax WT activé par TOM22 ΔC et des nanodisques circularisés. Leur insertion spontanée dans des nanodisques monodisperses devrait considérablement réduire l'hétérogénéité pour permettre des études structurales par Cryo-EM.

Une autre approche que nous avons envisagée et déjà entamé est l'utilisation de l'échange proton deutérium couplé à la spectrométrie de masse. Cette approche permettra de déterminer les domaines des oligomères de Bax insérés dans la bicouche ce qui fournira plus de précisions sur les changements que Bax a subi au cours de son insertion.

Matériels et Méthodes

1. Construction des plasmides et génération des mutants

Le plasmide d'expression *in vitro* pIVEX2.3 MCS a été utilisé. Le cDNA codant Bax humain (dont le biais de codon est celui de la levure) a été cloné entre les sites Nde1 et Xho1. La construction initiale utilisait un codon de terminaison opale (TGA). Nous avons observé des fuites de la terminaison de la traduction. Nous avons remplacé ce codon par deux codons ocre (TAA).

Les cDNA codant TOM22 humain et Bcl-xL humain ont été clonés entre les sites Nde1 et Xho1 du même plasmide.

Les mutagenèses ont été réalisées par la méthode du «quickchange» selon le protocole décrit par Liu et al (2008) [285].

Le milieu réactionnel contient :

Oligonucléotides mutagènes 1 μ M chaque (0.5 μ L d'une solution à 100 μ M)

dNTP 250 μ M chaque (0.5 μ L d'une solution à 25mM chaque)

HF Phusion Buffer 1x (10 μ L de 5X)

Plasmide 50ng

Phusion DNA polymerase 1-2 unités

Eau qualité Biologie Moléculaire qsp 50 μ l

Les cycles de PCR sont les suivants :

94°C, 7 min

Cycle 1 (x12)

94°C, 1 min

60°C, 1 min

72°C, 10 min

Cycle 2 (x3)

95°C, 1 min

50°C, 1 min

72°C, 10 min

72°C, 20 min

4°C, ∞

Après la synthèse, 0.5µL d'enzyme Dpn1 sont ajoutés et incubés pendant 2 heures à 37°C.

Des bactéries DH5α compétentes sont transformées avec 4µL du mix. L'ADN plasmidique de deux clones positifs a été envoyé au séquençage pour vérification. Le tableau ci-dessous contient la liste des oligonucléotides mutagènes utilisés.

Certains mutants étaient déjà construits dans le plasmide de levure pYES3/CT. Ils ont été amplifiés avec des oligonucléotides adéquats et reclés dans le pIVEX2.3 MCS.

2. Synthèse et purification des protéines et des nanodisques

2.1. Synthèse de Bax en «Cell-free» en présence ou en absence de nanodisques

Le système de synthèse en échange continu décrit par Schwarz et al (2007) a été utilisé pour la synthèse de Bax [203]. Le milieu réactionnel (RM) est séparé du mélange nourricier (FM) par une membrane de dialyse de 10kDa de «cut-off».

Le mélange nourricier (1700µL de volume final) est composé de 0,1 M K/HEPES (pH 8,0), 1 mM EDTA, 0,05% NaN₃, 2% PEG 8000, 151 mM acétate de potassium, 7,1 mM acétate de magnésium, 0,1 mg/mL acide folinique (sel de calcium), 2 mM DTT, 1 mM de chaque NTP, 0.5 mM de chaque acide aminé, 1 mM de chacun des acides aminés RDEWCM, 20 mM de K/PEP, 20 mM d'acétylphosphate (sel Li/K) et un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Compleat sans EDTA, Roche, Bâle, Suisse).

Le mélange réactionnel (100µL de volume final), en plus de tout les composants du mélange nourricier, a été supplémenté avec des composants nécessaires à la synthèse à savoir : 35 % (v/v) de lysat S30 d'*E. coli* BL21DE3 (dans un tampon Tris/acétate 10 mM, pH 8,2, 14 mM d'acétate de magnésium, 0,6 mM d'acétate de potassium et 0,5 mM de DTT), , 0,04 mg/mL de pyruvate kinase (Sigma), 0,5 mg/mL de mélange d'ARNt (Roche), 6 unités/mL d'ARN polymérase T7, 3 unités/mL de RNasin (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) et 15 µg/mL de plasmide pIVEX exprimant les différents variants de Bax (voir section résultats). Pour les conditions de synthèse en présence de nanodisques, 3,5µM final de nanodisques (basé sur la concentration de MSP1E3D1) dont la composition mime celle de la MOM (MOM-ND-His7) ont été ajoutés, et le volume final a été ajusté à 100µL avec H₂O milliQ.

Le système est ensuite incubé à 28°C sous agitation douce pendant environ 15 heures.

Après incubation, les milieux réactionnels ont été centrifugés (20000 x g, 15 minutes à 4°C), Les culots ont été repris dans un volume équivalent à celui du surnageant en tampon Bax (200mM

NaCl, 25mM Hepes pH 7,4 et 0,1mM EDTA). Les surnageants ont été chargés sur 100µL de suspension de résine Ni-NTA (Quiagen) et incubés sous agitation pendant 2 heures. La fraction non-retenue (NR) a été isolée par centrifugation (2000 x g, 30 secondes). La résine a été lavée avec 500µL de tampon lavage (500mM NaCl, 20mM Tris pH 8) (3 à 5 lavages de 5 minutes). L'élution a été réalisée avec un volume équivalent au volume de la fraction non-retenue en tampon d'élution (200mM NaCl, 20mM Tris pH8 et 300mM d'imidazole).

Des aliquotes des fractions culots (C), surnageants (Sn), non-retenue (NR) et éluats (EL) ont été analysés par SDS-PAGE révélé au bleu de Coomassie ou par western blot.

Des quantités équivalentes de matériel ont été déposées pour les culots et les surnageants d'une part et pour les éluats et les fractions non-retenues d'autre part.

Pour les conditions de co-synthèse, les mélanges ont été préparés comme décrit ci-dessus, 15 µg/mL de plasmide pIVEX exprimant les différents variants de Bax et 7,5µg/µL de plasmide pIVEX exprimant la seconde protéine (voir section résultats).

2.2. Préparation de l'extrait d'*E.coli* (S30) pour 1L de culture

Milieux et tampons	Composition
Milieu YT 2x	12g de Yeast Extract, 19,2g de Tryptone et 6g de NaCl(pour 600mL).
Glucose 20%	20g de glucose (pour 100mL).
Tampon phosphate 5x	3,75g de KH ₂ PO ₄ et 11,4g de K ₂ HPO ₄ (pour 250mL).
Milieu de culture YT final	550mL YT 2x, 220mL de tampon phosphate 5x, 100mL de Glucose 20% et 220mL H ₂ O (1L).
Tampon A/B 50x	700mM Acétate de Mg, 30mM KCl et 500mM Tris pH 8,2 ajusté avec de l'acide acétique.
Tampon A	10mL de tampon A/B 50x, 250µL β-mercaptoéthanol (à ajouter au dernier moment) (pour 500mL).
PMSF 100mM	13,3 mg pour 763µL d'Ethanol (à ajouter au dernier moment)
Tampon B	1mL de tampon A/B50x, 1mM de DTT et 100µM de PMSF (pour 50mL).

Tampon C	14mM acétate de Mg, 60mM acétate de K, 500mM Tris pH8,2 ajusté avec l'acide acétique et 0,5mM de DTT (pour 2L).
----------	---

100µL de bactéries BL21DE3* ont été étalées sur du milieu YT agar. Des colonies isolées ont été sélectionnées et pré-cultivées dans 20mL de milieu YT final sans glucose.

Le milieu YT final a été ensemencé à 0,02 de DO_{600nm} à 37°C sous agitation (180 rpm). Entre 2,4 et 2,8 de DO_{600nm}, la croissance a été arrêtée rapidement en refroidissant le milieu (de 37° à 15°C en 15 minutes environ), et les bactéries ont été récoltées (5000 rpm 4°C, 10min). Le culot bactérien a été lavé deux fois avec 100mL de tampon A et le culot bactérien pesé.

Le culot final a été repris avec 1,1 fois le poids du culot bactérien en volume de tampon B, et les bactéries ont été cassées à la Presse de French (pression 2,00 kPsi). Les débris cellulaires ont été éliminés par deux étapes successives d'ultracentrifugation, 16000 rpm, pendant 30 min à 4°C (Beckmann optima L90K rotor 50Ti). 0,4M final de NaCl a été ajouté et incubé à 42°C pendant 45min au bain-Marie (cette étape permet de précipiter l'ARNm bactérien). Après le bain-Marie, une dialyse contre le tampon C final a été réalisée. Une dernière étape d'ultracentrifugation à 16000 rpm pendant 30 min à 4°C a permis d'éliminer les ARNm précipités. Le surnageant de cette dernière centrifugation représente l'extrait S30. Les protéines ont été dosées et l'extrait a été aliquoté, congelé dans de l'azote liquide et stocké à -80°C.

2.3. Purification de la T7 ARN polymérase pour 1L de culture

Milieus et tampons	Composition
Tampon de lyse	20mM NaCl, 2mM EDTA, 1mM DTT et 20mM Tris pH 8,1(100mL)
Tampon de re-suspension	20mM NaPi pH 7,7 1mM DTT, 5% glycérol (w/v),
Tampon HS équilibre	20mM NaPi pH 7,7 1mM DTT, 5% glycérol (w/v), et 50mM NaCl
Tampon HS élution	20mM NaPi pH 7,7 1mM DTT, 5% glycérol (w/v), et 500mM NaCl
Tampon T7	100mM NaCl, 1mM DTT, 0,1mM EDTA, 20mM Tris pH 8 et 50% glycérol (V/V).

Des bactéries BL21DE3 ont été transformées avec le plasmide pAR1219 codant pour la T7 ARN polymérase et étalées sur du milieu LB agar contenant 30 mg/L d'ampicilline. Des colonies isolées ont été sélectionnées et pré-cultivés dans 20mL de milieu LB.

1L de milieu LB contenant 30 mg/L d'ampicilline a été ensemencé à 0,02 de DO à 37°C sous agitation (180 rpm). L'induction a été réalisée avec 1mM final d'IPTG à 0,8 de DO. Les bactéries ont été récoltées à 1,9 de DO par centrifugation à 5000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le culot bactérien a été resuspendu avec 24 mL de tampon de lyse. La paroi bactérienne a été cassée par l'ajout de 9 mg de lysozyme de blanc d'œufs (Sigma-Aldrich), une pastille de cocktail anti-protéases (Complete, Roche) a été ajoutée et le mélange a été incubé à 4°C pendant 20 minutes. Ajout de 2,5mL de Déoxycholate à 0,8% (w/v Sigma-Aldrich) pour compléter la lyse des bactéries (incubation sous-agitation pendant 5 minutes). La viscosité due à l'ADN a été réduite par sonication à 120V (Annemasse Sonicator), quatre fois 30 secondes. 5mL de sulfate d'ammonium à 2M a été ajouté et complété à 50mL avec le tampon de lyse. Les fragments d'ADN et les polymérases qui y sont associées ont été précipités par l'ajout (goutte par goutte) de 5mL de Polymine P à 10% (w/v Sigma-Aldrich) ajusté à pH 8 avec du HCl et incubé à 4°C pendant 20 minutes sous agitation magnétique. Les débris ont été éliminés par centrifugation à 32000 x g pendant 20 minutes à 4°C. Les protéines ont été précipitées par ajout (goutte par goutte) de sulfate d'ammonium saturé (0,8 fois le volume du lysat) sous agitation magnétique. Le culot protéique a été récupéré par centrifugation à 20000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot a été repris dans 15 mL de tampon de resuspension supplémenté avec 100 mM de NaCl, et dialysé deux fois contre ce même tampon (membrane 10 kDa de cut-off). Le lysat a été centrifugé à 20000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Un volume équivalent à celui du surnageant a été ajouté en tampon de resuspension pour réduire la quantité de NaCl à 50mM. La purification a été réalisée sur une colonne de sulfopropyl (POROS, HS/20, 10/100) montée sur un système FPLC (ÄKTA purifier). La colonne a été équilibrée avec le tampon «équilibre» (avec deux volumes de colonne à 8 mL/minute) et 5 mL de lysat a été chargé sur la colonne à 0,5 mL/minute et éluées à 2 mL/minute avec le tampon d'élué avec un gradient de 50 à 500 mM de NaCl en 20 minutes. La T7 RNA polymérase élut entre 300 et 430 mM de NaCl. Les éluats ont été regroupés et concentrés à environ 5 mL dans des concentrateurs Vivaspin (cut-off de 30kDa). Les protéines ont été dosées et la concentration a été ajustée à 5 mg/mL. Les échantillons ont été dialysés deux fois contre 500 mL de tampon T7 et stockés à -80°C.

2.4. Préparation des nanodisques

La préparation des nanodisques a été réalisée comme suit : 2,5 mg de 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (POPC) dans du chloroforme (Anatrace, Maumee, OH, USA) ont été séchés pendant 3 heures sous flux d'argon. Le film lipidique sec a été resolubilisé dans un tampon de nanodisque (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, et 200 mM cholate de sodium). Ensuite, 1,5mg de His7-MSP1E3D1 a été ajouté et incubé pendant 1 h. Le détergent a été éliminé en ajoutant 150 mg de BioBeads SM-2 (Bio-Rad) pendant 3h. L'échantillon a ensuite été centrifugé à $20000 \times g$ pendant 15 min à 4°C, filtré à travers une membrane de 0,22 μm , et chargé sur une colonne de chromatographie d'exclusion par la taille (Superdex 200 10/300GL, Cytiva). La chromatographie a été effectuée dans le même tampon (sans cholate) à un flux de 0,5mL par minute. Au besoin, les nanodisques ont été concentrés dans des tubes Vivaspinn (cut-off de 30kDa) (concentration finale : 0,2 à 0,4 mM His7-MSP1E3D1) et stocké à 4°C.

Des nanodisques de compositions lipidiques différentes ont été préparés suivant le même protocole à savoir :

- Un mélange de phospholipides mimant la composition de la MOM, 48% POPC, 32% POPE, 12% DOPS et 8% de cardiolipides (w/w).
- Un mélange d'extrait polaire de lipide d'E. coli (Avanti 100600C) qui contient principalement de la phosphatidyléthanolamine (PE),
- Un mélange de phosphatidylcholine (POPC) et de phosphatidylglycérol (PG) dans un rapport 3:1.

2.5. Co-formation des nanodisques contenant Bax WT ou Bax P168A

2,5mg d'un mélange POPC/POPG 3/1 (w/w) dans du chloroforme (Anatrace) ont été séchés pendant 3 heures sous flux d'argon. Le film lipidique sec a été resolubilisé dans un tampon de co-formation (20mM Tris/HCl, pH 8.0, 200mM NaCl, 200mM Cholate de sodium). Les protéines BaxWT ou BaxP168A résolubilisées dans le Brij-58 (voir résultats partie 2) ont été chargées sur des colonnes d'élimination de détergent (Pierce) afin d'éliminer l'excès de Brij-58. Le rendement de récupération des protéines était d'environ 50 %. Le reste du protocole était similaire à celui de la préparation des nanodisques vides (voir ci-dessus).

2.6. Reconstitution de HisBax WT et HisBax P168A dans les nanodisques par double purification

His6-BaxWT et His6-BaxP168A ont été synthétisés en système «cell-free» en présence de nanodisques formés avec StrepII-MSP1E3D1. Comme pour la synthèse de Bax non étiqueté en présence de His7-MSP1E3D1, une grande proportion de Bax a été précipitée. Néanmoins, le surnageant contenant les nanodisques (0,5mL) a été chargé sur une suspension de résine de sépharose StrepII-Tactin (IBA) et incubé pendant une nuit à 4°C sous légère agitation. Les billes de sépharose ont été lavées plusieurs fois avec un tampon Tris/HCl 100mM (pH 8,0) contenant 150mM de NaCl et 1mM d'EDTA. L'élution a été réalisée en ajoutant le même tampon contenant 50mM de biotine et incubé pendant une nuit à 4°C sous agitation douce. Les fractions éluats ont été dialysées dans un tampon Na/Hepes 20mM (pH 7,8) contenant 150mM de NaCl. Le dialysat a ensuite été chargé sur une suspension de résine Ni-NTA superflow (Qiagen) et incubé pendant une nuit à 4°C sous agitation douce. La résine a été lavée deux fois avec le tampon (100mM NaCl, 10mM Tris pH8), et l'élution a été effectuée avec le même tampon contenant 250mM d'imidazole. L'éluat a été dialysé dans le même tampon sans imidazole et concentré à l'aide des concentrateurs Vivaspin (cut-off 30 kDa).

2.7. Purification de la protéine d'échafaudage des nanodisques (His7-MSP1E3D1)

Milieux et tampons	Composition
LB	0,5 % d'extrait de levure, 1 % de tryptone, 1 % de NaCl
TB	2,4 % d'extrait de levure, 1,2 % de tryptone, 0,5 % de glycérol et 8,9 mM de tampon phosphate de sodium ; pH 7,0
Tampon de dessalage	10 mM Tris/HCl pH 8,0 et 100 mM NaCl
Tampon de lyse	100 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,6, 50 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM Pic8340 (inhibiteurs de protéases, Sigma), 1 mM AEBSF, 1% Triton X100, et une pastille de Complete™ sans EDTA.
Tampon 1	40 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, et 1% Triton X100
Tampon 2	40 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, et 50 mM cholate de sodium
Tampon 3	40 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, et 50 mM imidazole

Tampon élution	40 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl et 300 mM imidazole
----------------	--

Des bactéries BL21DE3 ont été transformées avec le plasmide pET28b codant pour His7-MSP1E3D1 (Addgene) et étalées sur un milieu LB agar contenant 30 mg/L de kanamycine. Une colonie isolée a été précultivée dans un milieu LB contenant 30 mg/L de kanamycine pendant une nuit à 37°C. La préculture a été inoculée dans 1L de milieu TB contenant 30mg/L de kanamycine à $OD_{600} = 0,2$ et a été laissée en culture jusqu'à $OD_{600} = 0,9$. L'expression de His7-MSP1E3D1 a été induite par l'ajout de 1mM IPTG, et la croissance a été prolongée à 37°C jusqu'à ce que l' OD_{600} atteigne 1,8. Les cellules ont été culottées par centrifugation ($4000 \times g$, 10 min, 4°C, rotor Sorvall SLA1500), puis remises en suspension dans 30mL de tampon de lyse. Les cellules ont été lysées par sonication (50 % de pulsation, puissance 7 (max microTip), sept cycles de 30s de sonication suivis de 30s de pause). Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation ($46000 \times g$, 30min, 4°C, rotor Beckman 45Ti). Le surnageant a été chargé sur la nuit (en circuit fermé sur une pompe péristaltique) sur une colonne de Ni-NTA (HisTrap FF 5mL, Cytiva) préalablement équilibrée dans le tampon de lyse. Le circuit a été ouvert et la colonne a été lavée séquentiellement avec cinq volumes de colonne en tampons 1, 2 et 3. La colonne a ensuite été connectée à un purificateur Äkta et lavée avec un autre volume de tampon 3. Les protéines ont été éluées avec le tampon d'élution. L'éluat a ensuite été dialysé dans le tampon de dessalage et concentré à l'aide de concentrateurs Vivaspin (seuil de 10kDa, Sartorius). La protéine (~7 mg/mL) a été conservée sous forme d'aliquotes à -80 °C.

3.. Analyses biochimiques

3.1. Traitements des nanodisques au carbonate de sodium

Les fractions éluats de la première étape de purification ont été dialysées contre le tampon nanodisque (200mM NaCl, 20mM Tris pH8). Les échantillons ont ensuite été incubés avec 100mM de Na_2CO_3 pH 10 pendant 15 minutes. Les nanodisques ont ensuite été purifiés comme décrit ci-dessus.

3.2. Test d'accessibilité au N-éthylmaléimide Polyéthylène glycol (NEM-PEG)

Le marquage a été réalisée comme décrit par Dengler et al (2021) [225].

Les échantillons ont été incubés avec 0,2mM de NEM-PEG (Creative PEGworks) pendant 1 minute, puis la réaction a été arrêtée par ajout de 20mM de NEM (incubation 10 minutes). Les échantillons ont été analysés par western blot.

3.3. Immunoprécipitation et co-immunoprécipitation

Pour les tests d'immunoprécipitation, 1µg d'anticorps monoclonaux de souris anti-Bax 2D2 ou anti-Bax 6A7 (Santa-Cruz) a été ajouté aux échantillons et incubés pendant une nuit à 4°C. 50 µL d'une suspension de protéine G couplée à des billes d'agarose (Sigma) préalablement équilibrée dans du tampon (20mM Tris/HCl pH 8,0 ; 200mM NaCl) ont été ajoutés et incubés pendant 3h. Les billes d'agarose ont été lavées 5 fois sur des colonnes IP (Sigma) avec un tampon de lavage (25mM Tris/HCl pH 7,4, 500mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet P40, 10% glycérol) et 2 fois avec le même tampon à une dilution de 0,1x. Les protéines ont été récupérées par l'ajout de 30µL tampon de Laemmli sans β-mercaptoéthanol sur les billes et incubées à 65 °C pendant 15 minutes.

Pour les tests de co-immunoprécipitation de Bax et Bcl-xL ou Bax et TOM22 synthétisées en présence de nanodisques, après la purification des nanodisques, les fractions éluées ont été incubées avec 1µg d'anticorps monoclonal de souris anti-Bax (2D2, Santa-Cruz) ou d'anticorps monoclonal de lapin anti-Bcl-xL (E18, Abcam), ou d'anticorps anti-TOM22 (Abcam) ou d'anticorps anti HA (Thermo Fisher), et incubée sur la nuit à 4°C. Les autres étapes sont les mêmes que celles décrites ci-dessus.

Pour les tests de co-immunoprécipitation de Bax co-formé en nanodisques et Bcl-xL, 50ng de nanodisques contenant Bax ont été incubés avec 100 ng de Bcl-xL pendant 1h. 1µg d'anticorps monoclonal de souris anti-Bax (2D2, Santa-Cruz) ou d'anticorps monoclonal de lapin anti-Bcl-xL (E18, Abcam) ont été ajoutés et incubés pendant une nuit à 4°C. Les autres étapes sont les mêmes que celles décrites ci-dessus.

3.4. Préparation des LUV et test de perméabilisation

3 mg d'un mélange de phospholipides mimant la composition lipidique de la MOM (48% POPC, 32% POPE, 12% DOPS et 8% de cardiolipides w/w) ont été séchés pendant 3 h sous flux d'argon. Le film lipidique sec a été réhydraté dans un tampon LUV (25 mM Na/Hepes pH 7,5, 200mM NaCl) supplémenté avec 10mM de FITC-Dextran 10kDa (Sigma). Le mélange a été soniqué au bain-marie pendant 3 minutes et extrudé à travers une membrane Nucleopore Track-Etched de

400nm de diamètre de pore dans une extrudeuse Liposofast (Avestin). Les LUV ont été appliquées sur une colonne Sephadex-G50 à écoulement par gravité de 10mL. Des fractions de 1ml ont été recueillies et les fractions contenant des LUV ont été identifiées par leur aspect trouble.

Le test de libération de Dextran a été basé sur un protocole précédemment publié [240]. Un mélange contenant 20µL de LUV et 8 µg d'anticorps anti-FITC (Thermofisher) a été préparé. L'essai a été réalisé à 30°C à l'aide de plaques à 96 puits. BaxWT ou BaxP168A resolubilisés ont été passés dans une colonne d'élimination de détergents (Pierce) et ajoutés aux liposomes. La fiche technique indique que ces colonnes éliminent >95 % de la plupart des détergents, y compris le Brij-58, ce qui réduirait la concentration de Brij-58 à 0,0025 %. Après le passage sur la colonne, la concentration de Bax est de ~0,2 µg/µL, 0,1 µg a été ajouté à 100 µL de suspension de liposomes (concentration finale de Bax : 1 µg/mL). Par conséquent, la concentration finale de Brij-58 dans l'essai est d'environ 0,000125 %. La fluorescence du FITC a été mesurée toutes les 1 min pendant 60-90 min dans un lecteur de fluorescence pour microplaques (Clariostar, BMG Labtech). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ont été fixées à 495 nm et 521 nm, respectivement. Le 0 % de décroissance de la fluorescence a été mesuré sur le mélange de LUV et d'anticorps anti-FITC seul, et le 100 % de décroissance a été mesuré après l'ajout de 0,5 % de CHAPS.

3.5. Test de perméabilisation des LUV couplé à la synthèse en «cell-free»

Bax WT a été synthétisé seul ou co-synthétisé avec TOM22ΔC en présence de 20µL de LUV et 8 µg d'anticorps anti-FITC (Thermofisher) préparé comme décrit ci-dessus. En contrôle positif, Bax P168A et Bax R9E ont également été synthétisés. La perméabilisation des LUVs a été mesurée comme décrit ci-dessus en faisant une mesure toute les 10 minutes pendant 2 heures.

3.6. Test de dichroïsme circulaire

Les échantillons destinés à la mesure de la DC ont été dialysés dans un tampon phosphate de sodium 40 mM (pH 7,2) dans des cassettes de dialyse (Slide-A-Lyzer, Thermofisher) afin d'éliminer les ions Cl⁻. Les spectres UV lointains (190-260 nm) ont été mesurés sur un spectropolarimètre Jasco J-810 CD. L'acquisition a été réalisée à 25 °C avec une cellule de 1 mm de longueur de trajet optique sous atmosphère d'azote. Les fractions obtenues après la dialyse ont été diluées à 65-100 µg/mL dans 200 µL. 10 scans ont été recueillis de 260 à 190 nm à des intervalles de 0,5 nm, puis moyennés et corrigés de la ligne de base par soustraction des spectres des tampons. Ils ont été

analysés à Dichroweb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>) en utilisant l'algorithme CDSSTR [286] avec le jeu de données SP175 [287].

3.7. Dosage de protéines, SDS-PAGE et western blot

Les concentrations en protéines ont été déterminées par le dosage de l'acide bicinchonique (BCA) (ThermoFisher). Pour le SDS-PAGE et les Western-Blots, les échantillons de protéines ont été solubilisés dans un tampon de Laemmli (0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 2 % SDS, 2 % β -mercaptoéthanol, 10 % glycérol, 0,004 % bleu de bromophénol) et chauffés à 65 °C pendant 15 minutes. Les échantillons ont été soumis à une PAGE Tris/glycine 12,5 % SDS et transférés sur des membranes PVDF de 0,2 μ m (Hybond, Amersham) ou de Nitrocellulose (Protran, Cytiva).

Les membranes ont été saturées avec 5 % de lait dans du PBS-Tween 20 (ou du TBS-Tween 20 pour l'anticorps anti-Bcl-xL). Les anticorps primaires ont été ajoutés pendant une nuit à 4 °C et les anticorps secondaires ont été ajoutés pendant 45 minutes à température ambiante.

Les anticorps étaient les suivants : anticorps monoclonal de lapin anti-Bax humain (Abcam) dilution 1/5000, anticorps monoclonal de souris anti-Bax humain 2D2 (Santa-Cruz) dilution 1/5000, anticorps monoclonal de lapin anti-Bcl-xL (E18, Abcam) dilution 1/10 000, anticorps monoclonal de souris anti-his6 tag (clone 4E3D10H2/E3, ThermoFisher) dilution 1/10 000, anticorps monoclonal de souris anti-human porin (Abcam) dilution 1/50 000, anticorps polyclonal de lapin anti-mamalian cytochrome c (RD Biosystem) dilution 1/5 000, anticorps monoclonal de lapin anti-TOM22 humain (Abcam) dilution 1/10000, anticorps polyclonal de lapin anti-HA dilution 1/10000.

Les anticorps secondaires sont : IgG de chèvre anti-lapin couplée à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch) dilution 1/10 000, IgG de chèvre anti-souris couplée à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch) dilution 1/10 000. L'activité de la peroxydase a été révélée par chimiluminescence (Luminata Forte, Millipore), enregistrée avec une caméra numérique (G-Box, Syngene) et analysée avec Image J (<https://imagej.nih-gov.insb.bib.cnrs.fr/ij/>).

La coloration au bleu de Coomassie a été réalisée en incubant les gels dans de l'éthanol/eau/acide acétique 5/5/1 (v/v/v) pendant 10 minutes, en les colorant avec 0,25 % de bleu brillant de Coomassie G250 (Sigma) dans le même mélange pendant 10 minutes, et en les décolorant dans le même mélange jusqu'à ce que le rapport signal/bruit de fond soit satisfaisant.

Les graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Graphpad Prism 6.05 avec les outils d'analyse statistique intégrés. Sauf indication contraire, les produits chimiques proviennent de Sigma ou de Clinisciences.

3.8. Purification de l'hétérodimère Bax/Bcl-xL et transfert de Bax

Bax WT et Bcl-xL WT ont été co-synthétisés en "cell-free" en présence de 3,5 μ M final de MOM-ND-His7. Le milieu réactionnel a été ensuite centrifugé (20000x g pendant 15min à 4°C), le surnageant a été chargé sur 100 μ L de suspension de résine NiNTA et la purification des nanodisques a été réalisée comme décrit ci-dessus.

1 μ M final de WEHI-539 a été ajouté à la fraction élution et divisé en deux fractions. Une fraction a été incubée sur la nuit à 4°C avec des MOM-ND-strepII contenant TOM22 et l'autre avec des MOM-ND-strepII vides. Les nanodisques strepII ont été purifiés comme décrit ci-dessus et les fractions non-retenues et éluats ont été analysés par western blot.

3.9. Analyse MALDI-MS

Pour les analyses MALDI-MS, Bcl-xL a été synthétisé en «cell-free» en présence de 5µM final de MOM-ND-His7. Après centrifugation, le surnageant a été chargé sur 100µL de suspension de résine Ni-NTA Sepharose (Qiagen) et lavés trois fois avec le tampon lavage (10 mM Tris pH 8 et 500 mM de NaCl). Les billes ont ensuite été placées dans des colonnes IP (Pierce) et l'élution a été réalisée en solubilisant les nanodisques avec 200 µL du même tampon contenant 50 mM de cholate de sodium. Bcl-xL éluée a ensuite été dialysée trois fois dans un tampon MALDI (20 mM Tris pH 7,2, 20 mM NaCl et 5 mM DTT) pour éliminer le cholate, puis concentrée sur Vivaspinn («cut-off» de 10 kDa, Sartorius).

Bcl-xL recombinant exprimé dans *E. coli* a été purifié à partir des corps d'inclusion, selon le protocole décrit par Yao et al (2015) (Yao et al., 2016). La protéine a été stockée dans du Tris/HCl 20 mM (pH 8,0), du NaCl 450 mM et du DTT 10 mM. Avant les analyses MALDI-MS, la protéine a été dialysée deux fois dans le tampon MALDI.

Le MALDI a été réalisé au Centre Génomique Fonctionnel de Bordeaux (CGFB) par Stéphane Chaignepain.

Les étapes de dialyse sont essentielles pour réduire la quantité de cholate et de NaCl qui pourraient ultérieurement interférer avec la co-cristallisation de l'échantillon avec la matrice. Les échantillons ont été mélangés (1:1 v/v) avec une solution de matrice d'acide sinapique (10 mg/mL) dans 1:1 (v/v) d'acétonitrile/eau déionisée avec 0,1 % d'acide trifluoroacétique. Chaque mélange (2 µL) a été déposé sur la plaque cible MALDI en utilisant la méthode des gouttelettes séchées. Les analyses MALDI-MS ont été effectuées sur un spectromètre de masse MALDI-TOF (Ultraflex III, Bruker, Billerica, MA, USA) utilisé en mode linéaire. La calibration a été réalisée à partir des ions cytochrome c et myoglobine chargés individuellement ($[M + H]^+$ moyenne = 12 361,0 Da et $[M + H]^+$ moyenne = 16 952,3 Da, respectivement) et du dimère en phase gazeuse de ces protéines ($[2M + H]^+$ moyenne = 24 720,9 Da et $[2M + H]^+$ moyenne = 33 903,6 Da, respectivement). Les spectres de masse ont été acquis en faisant la moyenne de 8000 clichés. Les spectres ont été traités (y compris la soustraction du bruit de fond et le lissage) à l'aide de FlexAnalysis (Bruker). Les masses expérimentales sont les moyennes de deux mesures indépendantes.

3.10. Isofocalisation électrique (IEF)

Bcl-xL a été synthétisé en «cell-free» en absence ou en présence de 3,5 μ M de MOM-ND-His7. Une condition de co-synthèse de Bax et Bcl-xL en absence de nanodisques a également été réalisé en contrôle. Les milieux réactionnels ont été centrifugés et les nanodisques contenant Bcl-xL ont été purifiés comme décrit ci-dessus. La fraction éluat et la fraction surnageant de la co-synthèse, ainsi que les deux contrôles (Bcl-xL «full length» ou Bcl-xL Δ C218) ont été mélangés avec 0,2% de Nonidet P40 et déposé sur gel IEF pH 3-10 (ThermoFisher) en suivant les instruction du fabricant. Les protéines ont été transférées sur membrane de PVDF et analysées par western blot.

3.11. Colorless Native PAGE (CN-PAGE)

Pour les analyses des nanodisques en CN-PAGE un volume équivalent de chaque fractions issues de la chromatographie d'exclusion par la taille ont été repris dans un tampon 50mM BisTris (pH 7,2), 50mM NaCl, 10 % glycérol, 0,001 % Rouge Ponceau S. La migration a été réalisée sur des gels natifs (Native PAGE 4-16% Bis-Tris gel ThermoFisher), dans un tampon BisTris 50mM, Tricine 50mM, pH 6.8, à 250mV. Les étapes étapes du western blot ont été réalisées comme décrit ci-dessus.

3.12. Microscopie électronique à transmission après coloration négative (TEM)

Les expériences de TEM ont été réalisées au CBMN par Laetitia Daury.

Les nanodisques ont été colorés négativement selon Daury et al (Daury et al., 2016). L'échantillon a été appliqué sur une grille de 300 mailles en cuivre recouverte de carbone déchargé par incandescence et coloré avec une solution d'acétate d'uranyle à 2 % (w/v). Les images ont été enregistrées dans des conditions de faible dose sur un microscope électronique Tecnai F20 FEG (FEI, ThermoFisher Scientific) fonctionnant à 200 kV et utilisant une caméra Eagle 4k_4k (ThermoFisher Scientific).

La surface des nanodisques a été mesurée manuellement avec Image J (<https://imagej.nih.gov/insb.bib.cnrs.fr/ij/>) et le plugin dm3 reader (https://imagej.nih.gov/insb.bib.cnrs.fr/ij/plugins/DM3_Reader.html). Le diamètre moyen a été calculé en considérant qu'il s'agissait de disques parfaits.

3.13. Culture cellulaire et préparation de mitochondries isolées

Milieux et tampons	Composition
Tampon MB	210mM mannitol, 70mM saccharose, 1mM EDTA et 10mM Hepes pH7,7

Les cellules HEK ou HCT116 Bax KO ont été cultivées dans un milieu Mccoy's 5A (ThermoFisher) supplémenté de glutamine, de sérum de veau foetal, de pénicilline et de streptomycine à 37°C à 5% de CO₂. Elles sont cultivés en plateau.

Les cellules ont été lavées avec 20mL de PBS et décollée de la plaque par décollement mécanique. Les cellules ont ensuite été récoltées par centrifugation (800 x g à 4°C pendant 5 minutes). Le culot cellulaire a été resuspendu dans 10mL de tampon MB supplémenté avec une pastille de cocktail d'antiprotéases (Complete mini, Roche). Les cellules ont été homogénéisées dans un Potter de Dounce (30 passages pour les HEK et 60 pour les HCT116). Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation (600 x g à 4°C pendant 5 minutes). Le surnageant a été recentrifugé (800 x g à 4°C pendant 5 minutes). Les mitochondries ont été isolées en réalisant une centrifugation à 8000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot de mitochondrie a ensuite été resuspendu dans 200µL de tampon MB, complété à 2 mL et centrifugé à nouveau (8000 x g pendant 10 minutes à 4°C). Le culot de mitochondrie a été resuspendu dans 200 µL de tampon MB, utilisé directement.

3.14. Transfert de Bax et perméabilisation des mitochondries

Les mitochondries (30ng) ont été incubées avec 1µg d'anticorps anti TOM22 (Abcam) ou sans anticorps pendant 1h. Les nanodisques contenant l'hétérodimère Bax/Bcl-xL ont été ajouté dans toutes les conditions. 1µM final de BH3 mimétique WEHI-539 a été ajouté dans les conditions "+WEHI-539". Les échantillons ont été incubés sur la nuit à 4°C. Les mitochondries ont été récupérées par centrifugation à 8000x g à 4°C, solubilisé dans 20µL de tampon de Laemmli et analysé par western blot. Les quantités de cytochrome c mitochondriale et de VDAC ont été déterminées par densitométrie (en utilisant le logiciel image J).

4. Séquences des oligonucléotides

Séquence du cDNA de Bax humain "levurisé"

ATGGACGGTTCGGGTGAACAACCAAGAGGTGGGGTCCAACCTCCTCTGAACAAATCATGAAGACT
GGTGCCTTGTTGCTTCAAGGTTTCATCCAAGACAGAGCTGGTAGAATGGGTGGTGAAGCTCCAGAA
TTGGCCTTGACCCAGTTCCACAAGACGCTTCCACCAAGAAGTTGTCTGAATGTTTGAAGAGAATC
GGTGACGAATTGGACTCTAACATGGAATTGCAAAGAATGATTGCCGCTGTCGACACCGACTCCCCA
AGAGAAGTCTTCTTCAGAGTCGCCGCTGACATGTTCTCTGACGGTAACTTCAACTGGGGTAGAGTT
GTCGCCTTGTTCTACTTCGCCTCTAAGTTGGTCTTGAAGGCCTTGTGTACCAAGGTCCCAGAATTG
ATCAGAACCATCATGGGTTGGACTTTGGACTTCTTGAGAGAAAGATTGTTGGGTTGGATCCAAGAC
CAAGGTGGTTGGGACGGTTTGTGTCCTACTTCGGTACTCCAACCTGGCAAACCGTTACCATCTTC
GTTGCCGGTGTCTTGACCGCCTCTTTGACCATCTGGAAGAAGATGGGTTGA

Oligonucléotides mutagènes

A24R (pour BaxFL)

GACTGGTcgCTTGTTGCTTCAAGGTTTCATCCAAGACAGAGCTG (sens)
GCAACAAGcgACCAGTCTTCATGATTTGTTTCAGAGGAGGTTGGAC (antisens)

A24R (pour BaxPSI)

GACTGGTcgCTTGTTGCTTCAAGGTTTCATCCAAGACAGAGCTGG (sens)
GCAACAAGcgACCAGTCTTCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTTC
(antisens)

T174P

GCAAACCGTTcCCATCTTTCGTTGCCGGTGTCTTGACCG (sens)
GAAGATGGgAACGGTTTGCCAAGTTGGAGTACCGAAGTAGGAC (antisens)

D154Y

GGATCCAAaACCAAGGTGGTTGGGACGGTTTGTGTCCTAC (sens)
CACCTTGGTaTTGGATCCAACCCAACAATCTTCTCTCAAGAAGTCC (antisens)

D154K

GGATCCAAaAgCAAGGTGGTTGGGACGGTTTGTGTCCTACTTC (sens)
CCACCTTGcTtTTGGATCCAACCCAACAATCTTCTCTCAAGAAGTCC (antisens)

R9E

GAACAACCAgaAGGTGGGGTCCAACCTCCTCTGAAC (sens)
CCCCACCTtctGGTTGTTTACCAGGAAACCGTCCATATG (antisens)

L26Q

GTGCCTTGCAGCTTCAAGGTTTCATCCAAGACAGAGCTGGTAG (sens)
CTTGAAGCTGCAAGGCACCAGTCTTCATGATTTGTTTCAGAGGAGG (antisens)

V177C

CATCTTCTGTGCCGGTGTCTTGACCGCCTCTTTG (sens)
CACCGGCACAGAAGATGGTAACGGTTTGCCAAGTTG (antisens)

Bax-deltaC169

ACGTCTCGAGTTTATCAAGTTGGAGTACCGAAGTAGGAC (antisens)

BaxΨ

GGAATTCATATGAAGACTGGTGCCTTGTTGCTTC (sens)

Tom22-A6S

GCCGTCTCTGCTGCCGGTGCAGGGGAACCCAG (sens)

GCAGCAGAGACGGCGGCAGCCATATGTATATCTCCTTCTTAAAG (antisens)

Tom22-E33G

GAGCTGGGGGAGGACGACGATGAGGAGCTAGATGAGACCCTG (sens)

CGTCCTCCCCAGCTCCTCCTCAGGCTTCTCCGCGTC (antisens)

Tom22-D24H

GAAAGGCCACGCGGAGAAGCCTGAGGAGGAGCTGGAGG (sens)

CTCCGCGTGGCCTTTCGGGAGCAATTCGTCCGGGGAC (antisens)

Tom22-E33K

GGAGCTGAAGGAGGACGACGATGAGGAGCTAGATGAGACC (sens)

CGTCCTCCTTCAGCTCCTCCTCAGGCTTCTCCGCGTC (antisens)

Tom22-E38K

GACGACGATAAGGAGCTAGATGAGACCCTGTCCGAGAGACTATG (sens)

CTAGCTCCTTATCGTCGTCCTCCTCCAGCTCCTCCTCAGG (antisens)

Tom22-S45D

GACCCTGgacGAGAGACTATGGGGCCTGACGGAGATGTTTCC (sens)

CATAGTCTCTCgTcCAGGGTCTCATCTAGCTCCTCATCGTCGTC (antisens)

Tom22-S45E

GACCCTGgaGAGAGACTATGGGGCCTGACGGAGATGTTTCC (sens)

CATAGTCTCTCctcCAGGGTCTCATCTAGCTCCTCATCGTCGTC (antisens)

Tom22-E46D

CCTGTGCGCAGAGACTATGGGGCCTGACGGAGATGTTTCCG (sens)

CATAGTCTCTGCGACAGGGTCTCATCTAGCTCCTCATCGTC (antisens)

Tom22-Q75H

GTGGCTCAcAAAATGTACAGGTTTTCCAGGGCAGCCTTGTGG (sens)

CTGTACATTTTgTGAGCCACAAAGAGGGAAAGATCAAAAGTGGCTCCGG (antisens)

Tom22-R79E

GAAAATGTACgaGTTTTCCAGGGCAGCCTTGTGGATTGGGACC (sens)

CCTGGAAAActcGTACATTTTCTGAGCCACAAAGAGGGAAAGATCAAAAG (antisens)

Tom22-F92L

CACTTCCTTGATGATCCTGGTTCTTCCCGTTGTCTTTGAGACGG (sens)

CAGGATCATCAAGGAAGTGGTCCCAATCCACAAGGCTGCC (antisens)

Tom22-P28S

CGGAGAAGTCTGAGGAGGAGCTGGAGGAGGACGACGATGAG (sens)
CCTCCTCAGACTTCTCCGCGTCGCCTTTCGGGAGCAATTTCG (antisens)

Tom22-HA

GACTGCTCGAGCTTATTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGATCTTCCAGGAAGTGAG (antisens)

Tom22ΔC (1-52)

ACGTCTCGAGCTACGTCAGGCCCCATAGTCT (antisens)

Bcl-xL-Stop213

CAGGAACGCTTCAACCGCTGATTCTGACGGGCATGACTG (sens)
CAGTCATGCCCGTCAGAATCAGCGGTTGAAGCGTTCCTG (antisens)

Bcl-xL-Stop228

GTGGTTCTGCTGGGCTGACTCTTCAGTCGGAAATGA (sens)
TCATTTCCGACTGAAGAGTCAGCCCAGCAGAACCAC (antisens)

Bcl-xL-A221R

GGCATGACTGTGCGCGGCGTGGTTCTG (sens)
CAGAACCACGCCGCGCACAGTCATGCC (antisens)

Bibliographie

- [1] L. Lovrekovich, Z. Klement, et G. L. Farkas, « TOXIC EFFECT OF PSEUDOMONAS TABACI ON RNA METABOLISM IN TOBACCO AND ITS COUNTERACTION BY KINETIN », *Science*, vol. 145, n° 3628, p. 165, juill. 1964, doi: 10.1126/science.145.3628.165.
- [2] R. A. Lockshin et C. M. Williams, « PROGRAMMED CELL DEATH--I. CYTOLOGY OF DEGENERATION IN THE INTERSEGMENTAL MUSCLES OF THE PERNYI SILKMOTH », *J Insect Physiol*, vol. 11, p. 123-133, févr. 1965, doi: 10.1016/0022-1910(65)90099-5.
- [3] J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, et A. R. Currie, « Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics », *Br J Cancer*, vol. 26, n° 4, Art. n° 4, août 1972, doi: 10.1038/bjc.1972.33.
- [4] A. L. Edinger et C. B. Thompson, « Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy », *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 16, n° 6, p. 663-669, déc. 2004, doi: 10.1016/j.ceb.2004.09.011.
- [5] D. Tang, R. Kang, T. V. Berghe, P. Vandenabeele, et G. Kroemer, « The molecular machinery of regulated cell death », *Cell Res*, vol. 29, n° 5, Art. n° 5, mai 2019, doi: 10.1038/s41422-019-0164-5.
- [6] C. A. Ray et D. J. Pickup, « The mode of death of pig kidney cells infected with cowpox virus is governed by the expression of the crmA gene », *Virology*, vol. 217, n° 1, p. 384-391, mars 1996, doi: 10.1006/viro.1996.0128.
- [7] T. P. Ashford et K. R. Porter, « CYTOPLASMIC COMPONENTS IN HEPATIC CELL LYSOSOMES », *Journal of Cell Biology*, vol. 12, n° 1, p. 198-202, janv. 1962, doi: 10.1083/jcb.12.1.198.
- [8] B. Levine et D. J. Klionsky, « Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy », *Developmental Cell*, vol. 6, n° 4, p. 463-477, avr. 2004, doi: 10.1016/S1534-5807(04)00099-1.
- [9] M. Komatsu *et al.*, « Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice », *J Cell Biol*, vol. 169, n° 3, p. 425-434, mai 2005, doi: 10.1083/jcb.200412022.
- [10] R. Mathew, V. Karantza-Wadsworth, et E. White, « Role of autophagy in cancer », *Nat Rev Cancer*, vol. 7, n° 12, p. 961-967, déc. 2007, doi: 10.1038/nrc2254.
- [11] W. Bursch *et al.*, « Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy », *Carcinogenesis*, vol. 17, n° 8, p. 1595-1607, août 1996, doi: 10.1093/carcin/17.8.1595.
- [12] X. H. Liang *et al.*, « Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1 », *Nature*, vol. 402, n° 6762, p. 672-676, déc. 1999, doi: 10.1038/45257.
- [13] S. Pattingre et B. Levine, « Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? », *Cancer Res*, vol. 66, n° 6, p. 2885-2888, mars 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4412.
- [14] M. Gao, P. Monian, Q. Pan, W. Zhang, J. Xiang, et X. Jiang, « Ferroptosis is an autophagic cell death process », *Cell Res*, vol. 26, n° 9, p. 1021-1032, sept. 2016, doi: 10.1038/cr.2016.95.
- [15] E. H. Baehrecke, « Autophagic programmed cell death in *Drosophila* », *Cell Death Differ*, vol. 10, n° 9, p. 940-945, sept. 2003, doi: 10.1038/sj.cdd.4401280.
- [16] M. Ogawa et C. Sasakawa, « Bacterial evasion of the autophagic defense system », *Curr Opin Microbiol*, vol. 9, n° 1, p. 62-68, févr. 2006, doi: 10.1016/j.mib.2005.12.007.
- [17] M. Obeid *et al.*, « Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death », *Nat Med*, vol. 13, n° 1, Art. n° 1, janv. 2007, doi: 10.1038/nm1523.
- [18] V. A. Fadok *et al.*, « Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells », *J Immunol*, vol. 149, n° 12, p. 4029-4035, déc. 1992.

- [19] M. Leist, B. Single, A. F. Castoldi, S. Kühnle, et P. Nicotera, « Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis », *J Exp Med*, vol. 185, n° 8, p. 1481-1486, avr. 1997, doi: 10.1084/jem.185.8.1481.
- [20] T. Lindsten *et al.*, « The Combined Functions of Proapoptotic Bcl-2 Family Members Bak and Bax Are Essential for Normal Development of Multiple Tissues », *Mol Cell*, vol. 6, n° 6, p. 1389-1399, déc. 2000.
- [21] A. Ishizuya-Oka, T. Hasebe, et Y.-B. Shi, « Apoptosis in amphibian organs during metamorphosis », *Apoptosis*, vol. 15, n° 3, p. 350-364, mars 2010, doi: 10.1007/s10495-009-0422-y.
- [22] Y. Fuchs et H. Steller, « Programmed Cell Death in Animal Development and Disease », *Cell*, vol. 147, n° 4, p. 742-758, nov. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.10.033.
- [23] F. A. White, C. R. Keller-Peck, C. M. Knudson, S. J. Korsmeyer, et W. D. Snider, « Widespread Elimination of Naturally Occurring Neuronal Death in Bax-Deficient Mice », *J Neurosci*, vol. 18, n° 4, p. 1428-1439, févr. 1998, doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-04-01428.1998.
- [24] A. R. D. Delbridge et A. Strasser, « The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy », *Cell Death Differ*, vol. 22, n° 7, Art. n° 7, juill. 2015, doi: 10.1038/cdd.2015.50.
- [25] S. Vukosavic, M. Dubois-Dauphin, N. Romero, et S. Przedborski, « Bax and Bcl-2 interaction in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis », *J Neurochem*, vol. 73, n° 6, p. 2460-2468, déc. 1999, doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0732460.x.
- [26] K. Y. Soo, J. D. Atkin, M. Farg, A. K. Walker, M. K. Horne, et P. Nagley, « Bim links ER stress and apoptosis in cells expressing mutant SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis », *PLoS One*, vol. 7, n° 4, p. e35413, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0035413.
- [27] H. R. Horvitz, « Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* ».
- [28] A. Degterev et J. Yuan, « Expansion and evolution of cell death programmes », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 9, n° 5, p. 378-390, mai 2008, doi: 10.1038/nrm2393.
- [29] M. O. Hengartner et H. R. Horvitz, « *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2* », *Cell*, vol. 76, n° 4, p. 665-676, févr. 1994, doi: 10.1016/0092-8674(94)90506-1.
- [30] O. Julien et J. A. Wells, « Caspases and their substrates », *Cell Death Differ*, vol. 24, n° 8, Art. n° 8, août 2017, doi: 10.1038/cdd.2017.44.
- [31] G. S. Salvesen et A. Ashkenazi, « SnapShot: Caspases », *Cell*, vol. 147, n° 2, p. 476-476.e1, oct. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.09.030.
- [32] P. Li *et al.*, « Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade », *Cell*, vol. 91, n° 4, p. 479-489, nov. 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80434-1.
- [33] N. A. Thornberry et Y. Lazebnik, « Caspases: enemies within », *Science*, vol. 281, n° 5381, p. 1312-1316, août 1998, doi: 10.1126/science.281.5381.1312.
- [34] A. M. Verhagen *et al.*, « Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins », *Cell*, vol. 102, n° 1, p. 43-53, juill. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)00009-X.
- [35] Y. L. Yang et X. M. Li, « The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities », *Cell Res*, vol. 10, n° 3, p. 169-177, sept. 2000, doi: 10.1038/sj.cr.7290046.
- [36] C. Du, M. Fang, Y. Li, L. Li, et X. Wang, « Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition », *Cell*, vol. 102, n° 1, p. 33-42, juill. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)00008-8.
- [37] M. W. Gray, G. Burger, et B. F. Lang, « Mitochondrial evolution », *Science*, vol. 283, n° 5407, p. 1476-1481, mars 1999, doi: 10.1126/science.283.5407.1476.

- [38] C.-C. Mao et I. J. Holt, « Clinical and molecular aspects of diseases of mitochondrial DNA instability », *Chang Gung Med J*, vol. 32, n° 4, p. 354-369, 2009.
- [39] E. Blachly-Dyson et M. Forte, « VDAC channels », *IUBMB Life*, vol. 52, n° 3-5, p. 113-118, 2001, doi: 10.1080/15216540152845902.
- [40] M. Rigoulet *et al.*, « Cell energy metabolism: An update », *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, vol. 1861, n° 11, p. 148276, nov. 2020, doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148276.
- [41] « Bioenergetics - 3rd Edition ». Consulté le: 3 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://shop.elsevier.com/books/bioenergetics/nicholls/978-0-12-518121-1>
- [42] N. Wiedemann et N. Pfanner, « Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly », *Annu Rev Biochem*, vol. 86, p. 685-714, juin 2017, doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014352.
- [43] K. Model *et al.*, « Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex1 1Edited by M. Yaniv », *Journal of Molecular Biology*, vol. 316, n° 3, p. 657-666, févr. 2002, doi: 10.1006/jmbi.2001.5365.
- [44] Y. Araiso, K. Imai, et T. Endo, « Role of the TOM Complex in Protein Import into Mitochondria: Structural Views », *Annu Rev Biochem*, vol. 91, p. 679-703, juin 2022, doi: 10.1146/annurev-biochem-032620-104527.
- [45] W. Wang *et al.*, « Atomic structure of human TOM core complex », *Cell Discov*, vol. 6, n° 1, Art. n° 1, sept. 2020, doi: 10.1038/s41421-020-00198-2.
- [46] U. Ahting, M. Thieffry, H. Engelhardt, R. Hegerl, W. Neupert, et S. Nussberger, « Tom40, the Pore-Forming Component of the Protein-Conducting Tom Channel in the Outer Membrane of Mitochondria », *Journal of Cell Biology*, vol. 153, n° 6, p. 1151-1160, juin 2001, doi: 10.1083/jcb.153.6.1151.
- [47] W. Neupert et J. M. Herrmann, « Translocation of proteins into mitochondria », *Annu Rev Biochem*, vol. 76, p. 723-749, 2007, doi: 10.1146/annurev.biochem.76.052705.163409.
- [48] M. Yano, K. Terada, et M. Mori, « Mitochondrial Import Receptors Tom20 and Tom22 Have Chaperone-like Activity * », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, n° 11, p. 10808-10813, mars 2004, doi: 10.1074/jbc.M311710200.
- [49] S. I. Sim, Y. Chen, D. L. Lynch, J. C. Gumbart, et E. Park, « Structural basis of mitochondrial protein import by the TIM23 complex », *Nature*, vol. 621, n° 7979, p. 620-626, sept. 2023, doi: 10.1038/s41586-023-06239-6.
- [50] Y. Zhang *et al.*, « Structure of the mitochondrial TIM22 complex from yeast », *Cell Res*, vol. 31, n° 3, p. 366-368, mars 2021, doi: 10.1038/s41422-020-00399-0.
- [51] J. Qiu *et al.*, « Coupling of Mitochondrial Import and Export Translocases by Receptor-Mediated Supercomplex Formation », *Cell*, vol. 154, n° 3, p. 596-608, août 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.06.033.
- [52] H. Takeda *et al.*, « A multipoint guidance mechanism for β -barrel folding on the SAM complex », *Nat Struct Mol Biol*, vol. 30, n° 2, Art. n° 2, févr. 2023, doi: 10.1038/s41594-022-00897-2.
- [53] D. A. I. Mavridou, S. J. Ferguson, et J. M. Stevens, « Cytochrome c assembly », *IUBMB Life*, vol. 65, n° 3, p. 209-216, mars 2013, doi: 10.1002/iub.1123.
- [54] D. M. Hockenbery, Z. N. Oltvai, X. M. Yin, C. L. Milliman, et S. J. Korsmeyer, « Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis », *Cell*, vol. 75, n° 2, p. 241-251, oct. 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)80066-n.
- [55] S. A. Susin *et al.*, « Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease », *J Exp Med*, vol. 184, n° 4, p. 1331-1341, oct. 1996, doi: 10.1084/jem.184.4.1331.
- [56] R. M. Kluck, E. Bossy-Wetzels, D. R. Green, et D. D. Newmeyer, « The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis », *Science*, vol. 275, n° 5303, p. 1132-1136, févr. 1997, doi: 10.1126/science.275.5303.1132.

- [57] S. A. Susin *et al.*, « Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor », *Nature*, vol. 397, n° 6718, p. 441-446, févr. 1999, doi: 10.1038/17135.
- [58] H. Ye *et al.*, « DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor », *Nat Struct Mol Biol*, vol. 9, n° 9, Art. n° 9, sept. 2002, doi: 10.1038/nsb836.
- [59] A. Urbano *et al.*, « AIF suppresses chemical stress-induced apoptosis and maintains the transformed state of tumor cells », *The EMBO Journal*, vol. 24, n° 15, p. 2815-2826, août 2005, doi: 10.1038/sj.emboj.7600746.
- [60] D. L. Vaux, « Apoptogenic factors released from mitochondria », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1813, n° 4, p. 546-550, avr. 2011, doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.08.002.
- [61] X. Liu, C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, et X. Wang, « Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c », *Cell*, vol. 86, n° 1, p. 147-157, juill. 1996, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80085-9.
- [62] J. Yang *et al.*, « Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked », *Science*, vol. 275, n° 5303, p. 1129-1132, févr. 1997, doi: 10.1126/science.275.5303.1129.
- [63] D. McIlroy *et al.*, « An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes », *Genes Dev.*, vol. 14, n° 5, p. 549-558, janv. 2000, doi: 10.1101/gad.14.5.549.
- [64] L. Y. Li, X. Luo, et X. Wang, « Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria », *Nature*, vol. 412, n° 6842, Art. n° 6842, juill. 2001, doi: 10.1038/35083620.
- [65] D. De Stefani *et al.*, « VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca²⁺ signals to mitochondria », *Cell Death Differ*, vol. 19, n° 2, p. 267-273, févr. 2012, doi: 10.1038/cdd.2011.92.
- [66] A. Raffaello, D. De Stefani, et R. Rizzuto, « The mitochondrial Ca(2+) uniporter », *Cell Calcium*, vol. 52, n° 1, p. 16-21, juill. 2012, doi: 10.1016/j.ceca.2012.04.006.
- [67] P. Bernardi et A. Rasola, « Calcium and cell death: the mitochondrial connection », *Subcell Biochem*, vol. 45, p. 481-506, 2007, doi: 10.1007/978-1-4020-6191-2_18.
- [68] N. Zamzami *et al.*, « Mitochondrial control of nuclear apoptosis », *J Exp Med*, vol. 183, n° 4, p. 1533-1544, avr. 1996, doi: 10.1084/jem.183.4.1533.
- [69] C. P. Baines *et al.*, « Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death », *Nature*, vol. 434, n° 7033, p. 658-662, mars 2005, doi: 10.1038/nature03434.
- [70] T. Nakagawa *et al.*, « Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death », *Nature*, vol. 434, n° 7033, p. 652-658, mars 2005, doi: 10.1038/nature03317.
- [71] V. Basso, E. Marchesan, et E. Ziviani, « A trio has turned into a quartet: DJ-1 interacts with the IP3R-Grp75-VDAC complex to control ER-mitochondria interaction », *Cell Calcium*, vol. 87, p. 102186, mai 2020, doi: 10.1016/j.ceca.2020.102186.
- [72] G. Monaco *et al.*, « The BH4 domain of anti-apoptotic Bcl-XL, but not that of the related Bcl-2, limits the voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)-mediated transfer of pro-apoptotic Ca²⁺ signals to mitochondria », *J Biol Chem*, vol. 290, n° 14, p. 9150-9161, avr. 2015, doi: 10.1074/jbc.M114.622514.
- [73] N. Popgeorgiev et G. Gillet, « Bcl-xL and IP3R interaction: Intimate relationship with an uncertain outcome », *Cell Calcium*, vol. 101, p. 102504, janv. 2022, doi: 10.1016/j.ceca.2021.102504.
- [74] N. Echeverry, D. Bachmann, F. Ke, A. Strasser, H. U. Simon, et T. Kaufmann, « Intracellular localization of the BCL-2 family member BOK and functional implications », *Cell Death Differ*, vol. 20, n° 6, Art. n° 6, juin 2013, doi: 10.1038/cdd.2013.10.
- [75] S. W. Ryter *et al.*, « Mechanisms of cell death in oxidative stress », *Antioxid Redox Signal*, vol. 9, n° 1, p. 49-89, janv. 2007, doi: 10.1089/ars.2007.9.49.

- [76] C. Sauvanet, L. Arnauné-Pelloquin, C. David, P. Belenguer, et M. Rojo, « Dynamique et morphologie mitochondriales - Acteurs, mécanismes et pertinence fonctionnelle », *Med Sci (Paris)*, vol. 26, n° 10, Art. n° 10, oct. 2010, doi: 10.1051/medsci/20102610823.
- [77] S. Hoppins, L. Lackner, et J. Nunnari, « The machines that divide and fuse mitochondria », *Annu Rev Biochem*, vol. 76, p. 751-780, 2007, doi: 10.1146/annurev.biochem.76.071905.090048.
- [78] X. Liu, D. Weaver, O. Shirihai, et G. Hajnóczky, « Mitochondrial “kiss-and-run”: interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics », *EMBO J*, vol. 28, n° 20, p. 3074-3089, oct. 2009, doi: 10.1038/emboj.2009.255.
- [79] R. Quintana-Cabrera et L. Scorrano, « Determinants and outcomes of mitochondrial dynamics », *Mol Cell*, vol. 83, n° 6, p. 857-876, mars 2023, doi: 10.1016/j.molcel.2023.02.012.
- [80] M. Liesa, M. Palacín, et A. Zorzano, « Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease », *Physiological Reviews*, vol. 89, n° 3, p. 799-845, juill. 2009, doi: 10.1152/physrev.00030.2008.
- [81] T. Klecker *et al.*, « Interaction of MDM33 with mitochondrial inner membrane homeostasis pathways in yeast », *Sci Rep*, vol. 5, p. 18344, déc. 2015, doi: 10.1038/srep18344.
- [82] S. Desagher et J. C. Martinou, « Mitochondria as the central control point of apoptosis », *Trends Cell Biol*, vol. 10, n° 9, p. 369-377, sept. 2000, doi: 10.1016/s0962-8924(00)01803-1.
- [83] M. Karbowski *et al.*, « Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis », *Journal of Cell Biology*, vol. 159, n° 6, p. 931-938, déc. 2002, doi: 10.1083/jcb.200209124.
- [84] T. T. Renault *et al.*, « Mitochondrial Shape Governs BAX-Induced Membrane Permeabilization and Apoptosis », *Molecular Cell*, vol. 57, n° 1, p. 69-82, janv. 2015, doi: 10.1016/j.molcel.2014.10.028.
- [85] A. Jenner *et al.*, « DRP1 interacts directly with BAX to induce its activation and apoptosis », *EMBO J*, vol. 41, n° 8, p. e108587, avr. 2022, doi: 10.15252/embj.2021108587.
- [86] S. Hoppins *et al.*, « The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic complexes », *Mol Cell*, vol. 41, n° 2, p. 150-160, janv. 2011, doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.030.
- [87] J. M. Adams et S. Cory, « The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets », *Cell Death Differ*, vol. 25, n° 1, p. 27-36, janv. 2018, doi: 10.1038/cdd.2017.161.
- [88] Y. Tsujimoto, L. R. Finger, J. Yunis, P. C. Nowell, et C. M. Croce, « Cloning of the Chromosome Breakpoint of Neoplastic B Cells with the t(14;18) Chromosome Translocation », *Science*, vol. 226, n° 4678, p. 1097-1099, nov. 1984, doi: 10.1126/science.6093263.
- [89] D. L. Vaux, S. Cory, et J. M. Adams, « Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells », *Nature*, vol. 335, n° 6189, p. 440-442, sept. 1988, doi: 10.1038/335440a0.
- [90] Y. Tsujimoto, « Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? », *Genes to Cells*, vol. 3, n° 11, p. 697-707, 1998, doi: 10.1046/j.1365-2443.1998.00223.x.
- [91] A. Gross, J. M. McDonnell, et S. J. Korsmeyer, « BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis ». Consulté le: 25 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://genesdev.cshlp.org>
- [92] S. W. Muchmore *et al.*, « X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death », *Nature*, vol. 381, n° 6580, Art. n° 6580, mai 1996, doi: 10.1038/381335a0.
- [93] A. M. Petros, E. T. Olejniczak, et S. W. Fesik, « Structural biology of the Bcl-2 family of proteins », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1644, n° 2-3, p. 83-94, mars 2004, doi: 10.1016/j.bbamcr.2003.08.012.

- [94] X.-M. Yin, Z. N. Oltvai, et S. J. Korsmeyer, « BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax », *Nature*, vol. 369, n° 6478, Art. n° 6478, mai 1994, doi: 10.1038/369321a0.
- [95] D. C. S. Huang, J. M. Adams, et S. Cory, « The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4 », *The EMBO Journal*, vol. 17, n° 4, p. 1029-1039, févr. 1998, doi: 10.1093/emboj/17.4.1029.
- [96] A. Aouacheria, V. Rech de Laval, C. Combet, et J. M. Hardwick, « Evolution of Bcl-2 homology motifs: homology versus homoplasy », *Trends Cell Biol*, vol. 23, n° 3, p. 103-111, mars 2013, doi: 10.1016/j.tcb.2012.10.010.
- [97] V. Sora et E. Papaleo, « Structural Details of BH3 Motifs and BH3-Mediated Interactions: an Updated Perspective », *Front Mol Biosci*, vol. 9, p. 864874, 2022, doi: 10.3389/fmolb.2022.864874.
- [98] T. Chittenden *et al.*, « A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. », *The EMBO Journal*, vol. 14, n° 22, p. 5589-5596, nov. 1995, doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00246.x.
- [99] J. J. Hunter et T. G. Parslow, « A Peptide Sequence from Bax That Converts Bcl-2 into an Activator of Apoptosis (*) », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, n° 15, p. 8521-8524, avr. 1996, doi: 10.1074/jbc.271.15.8521.
- [100] T. Oltersdorf *et al.*, « An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours », *Nature*, vol. 435, n° 7042, p. 677-681, juin 2005, doi: 10.1038/nature03579.
- [101] S. T. Diepstraten, M. A. Anderson, P. E. Czabotar, G. Lessene, A. Strasser, et G. L. Kelly, « The manipulation of apoptosis for cancer therapy using BH3-mimetic drugs », *Nat Rev Cancer*, vol. 22, n° 1, p. 45-64, janv. 2022, doi: 10.1038/s41568-021-00407-4.
- [102] F. Janiak, B. Leber, et D. W. Andrews, « Assembly of Bcl-2 into microsomal and outer mitochondrial membranes », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, n° 13, p. 9842-9849, avr. 1994, doi: 10.1016/S0021-9258(17)36960-0.
- [103] T. Kaufmann, S. Schlipf, J. Sanz, K. Neubert, R. Stein, et C. Borner, « Characterization of the signal that directs Bcl-xL, but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane », *Journal of Cell Biology*, vol. 160, n° 1, p. 53-64, janv. 2003, doi: 10.1083/jcb.200210084.
- [104] L. H. Boise *et al.*, « bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death », *Cell*, vol. 74, n° 4, p. 597-608, août 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)90508-n.
- [105] T. W. Sedlak *et al.*, « Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 92, n° 17, p. 7834-7838, août 1995, doi: 10.1073/pnas.92.17.7834.
- [106] S. Otilie *et al.*, « Structural and Functional Complementation of an Inactive Bcl-2 Mutant by Bax Truncation », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, n° 27, p. 16955-16961, juill. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.27.16955.
- [107] A. J. Minn, « Bcl-xL regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and -independent mechanisms », *The EMBO Journal*, vol. 18, n° 3, p. 632-643, févr. 1999, doi: 10.1093/emboj/18.3.632.
- [108] T. T. Renault *et al.*, « Bcl-xL stimulates Bax relocation to mitochondria and primes cells to ABT-737 », *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 64, p. 136-146, juill. 2015, doi: 10.1016/j.biocel.2015.03.020.
- [109] F. Edlich *et al.*, « Bcl-xL Retrotranslocates Bax from the Mitochondria into the Cytosol », *Cell*, vol. 145, n° 1, p. 104-116, avr. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.034.
- [110] F. Todt, Z. Cakir, F. Reichenbach, R. J. Youle, et F. Edlich, « The C-terminal helix of Bcl-xL mediates Bax retrotranslocation from the mitochondria », *Cell Death Differ*, vol. 20, n° 2, Art. n° 2, févr. 2013, doi: 10.1038/cdd.2012.131.

- [111] K. M. Kozopas, T. Yang, H. L. Buchan, P. Zhou, et R. W. Craig, « MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 90, n° 8, p. 3516-3520, avr. 1993, doi: 10.1073/pnas.90.8.3516.
- [112] S. Krajewski *et al.*, « Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. », *Am J Pathol*, vol. 146, n° 6, p. 1309-1319, juin 1995.
- [113] T. Yang, K. M. Kozopas, et R. W. Craig, « The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. », *Journal of Cell Biology*, vol. 128, n° 6, p. 1173-1184, mars 1995, doi: 10.1083/jcb.128.6.1173.
- [114] J. Michels, P. W. M. Johnson, et G. Packham, « Mcl-1 », *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 37, n° 2, p. 267-271, févr. 2005, doi: 10.1016/j.biocel.2004.04.007.
- [115] Z. N. Oltval, C. L. Milliman, et S. J. Korsmeyer, « Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death », *Cell*, vol. 74, n° 4, p. 609-619, août 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)90509-O.
- [116] K. G. Wolter, Y.-T. Hsu, C. L. Smith, A. Nechushtan, X.-G. Xi, et R. J. Youle, « Movement of Bax from the Cytosol to Mitochondria during Apoptosis », *Journal of Cell Biology*, vol. 139, n° 5, p. 1281-1292, déc. 1997, doi: 10.1083/jcb.139.5.1281.
- [117] B. ANTONSSON, S. MONTESSUIT, S. LAUPER, R. ESKES, et J.-C. MARTINO, « Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria », *Biochemical Journal*, vol. 345, n° 2, p. 271-278, janv. 2000, doi: 10.1042/bj3450271.
- [118] M. Suzuki, R. J. Youle, et N. Tjandra, « Structure of Bax », *Cell*, vol. 103, n° 4, p. 645-654, nov. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)00167-7.
- [119] G. J. Griffiths *et al.*, « Cell Damage-induced Conformational Changes of the Pro-Apoptotic Protein Bak In Vivo Precede the Onset of Apoptosis », *Journal of Cell Biology*, vol. 144, n° 5, p. 903-914, mars 1999, doi: 10.1083/jcb.144.5.903.
- [120] E. H. Y. Cheng, T. V. Sheiko, J. K. Fisher, W. J. Craigen, et S. J. Korsmeyer, « VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis », *Science*, vol. 301, n° 5632, p. 513-517, juill. 2003, doi: 10.1126/science.1083995.
- [121] K. Hosoi *et al.*, « The VDAC2–BAK axis regulates peroxisomal membrane permeability », *Journal of Cell Biology*, vol. 216, n° 3, p. 709-722, févr. 2017, doi: 10.1083/jcb.201605002.
- [122] S. Y. Hsu, A. Kaipia, E. McGee, M. Lomeli, et A. J. Hsueh, « Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, n° 23, p. 12401-12406, nov. 1997, doi: 10.1073/pnas.94.23.12401.
- [123] S. Naim et T. Kaufmann, « The Multifaceted Roles of the BCL-2 Family Member BOK », *Front Cell Dev Biol*, vol. 8, p. 574338, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.574338.
- [124] K. Wang, X. M. Yin, D. T. Chao, C. L. Milliman, et S. J. Korsmeyer, « BID: a novel BH3 domain-only death agonist. », *Genes Dev.*, vol. 10, n° 22, p. 2859-2869, nov. 1996, doi: 10.1101/gad.10.22.2859.
- [125] S. Desagher *et al.*, « Bid-induced Conformational Change of Bax Is Responsible for Mitochondrial Cytochrome c Release during Apoptosis », *Journal of Cell Biology*, vol. 144, n° 5, p. 891-901, mars 1999, doi: 10.1083/jcb.144.5.891.
- [126] A. Letai, M. C. Bassik, L. D. Walensky, M. D. Sorcinelli, S. Weiler, et S. J. Korsmeyer, « Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics », *Cancer Cell*, vol. 2, n° 3, p. 183-192, sept. 2002, doi: 10.1016/S1535-6108(02)00127-7.

- [127] P.-F. Cartron *et al.*, « The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA », *Mol Cell*, vol. 16, n° 5, p. 807-818, déc. 2004, doi: 10.1016/j.molcel.2004.10.028.
- [128] L. O'Connor *et al.*, « Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis », *The EMBO Journal*, vol. 17, n° 2, p. 384-395, janv. 1998, doi: 10.1093/emboj/17.2.384.
- [129] H. Puthalakath, D. C. S. Huang, L. A. O'Reilly, S. M. King, et A. Strasser, « The Proapoptotic Activity of the Bcl-2 Family Member Bim Is Regulated by Interaction with the Dynein Motor Complex », *Molecular Cell*, vol. 3, n° 3, p. 287-296, mars 1999, doi: 10.1016/S1097-2765(00)80456-6.
- [130] P. Bouillet *et al.*, « The Role of the Pro-Apoptotic Bcl-2 Family Member Bim in Physiological Cell Death », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 926, n° 1, p. 83-89, 2000, doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05601.x.
- [131] K. Nakano et K. H. Vousden, « PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53 », *Molecular Cell*, vol. 7, n° 3, p. 683-694, mars 2001, doi: 10.1016/S1097-2765(01)00214-3.
- [132] J. R. Jeffers *et al.*, « Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways », *Cancer Cell*, vol. 4, n° 4, p. 321-328, oct. 2003, doi: 10.1016/s1535-6108(03)00244-7.
- [133] T. Kuwana *et al.*, « BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly », *Mol Cell*, vol. 17, n° 4, p. 525-535, févr. 2005, doi: 10.1016/j.molcel.2005.02.003.
- [134] H. Kim *et al.*, « Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies », *Nat Cell Biol*, vol. 8, n° 12, p. 1348-1358, déc. 2006, doi: 10.1038/ncb1499.
- [135] D. Ren *et al.*, « BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program », *Science*, vol. 330, n° 6009, p. 1390-1393, déc. 2010, doi: 10.1126/science.1190217.
- [136] H. Du, J. Wolf, B. Schafer, T. Moldoveanu, J. E. Chipuk, et T. Kuwana, « BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak », *J Biol Chem*, vol. 286, n° 1, p. 491-501, janv. 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.167148.
- [137] L. Simonyan *et al.*, « Non-phosphorylatable mutants of Ser184 lead to incomplete activation of Bax », *Front. Oncol.*, vol. 12, p. 1068994, janv. 2023, doi: 10.3389/fonc.2022.1068994.
- [138] U. Ahting, T. Waizenegger, W. Neupert, et D. Rapaport, « Signal-anchored Proteins Follow a Unique Insertion Pathway into the Outer Membrane of Mitochondria* », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, n° 1, p. 48-53, janv. 2005, doi: 10.1074/jbc.M410905200.
- [139] C. Motz, H. Martin, T. Krimmer, et J. Rassow, « Bcl-2 and Porin Follow Different Pathways of TOM-dependent Insertion into the Mitochondrial Outer Membrane », *Journal of Molecular Biology*, vol. 323, n° 4, p. 729-738, nov. 2002, doi: 10.1016/S0022-2836(02)00995-6.
- [140] L. Lalier *et al.*, « TOM20-mediated transfer of Bcl2 from ER to MAM and mitochondria upon induction of apoptosis », *Cell Death Dis*, vol. 12, n° 2, p. 182, févr. 2021, doi: 10.1038/s41419-021-03471-8.
- [141] C.-H. Chou, R.-S. Lee, et H.-F. Yang-Yen, « An internal EELD domain facilitates mitochondrial targeting of Mcl-1 via a Tom70-dependent pathway », *Mol Biol Cell*, vol. 17, n° 9, p. 3952-3963, sept. 2006, doi: 10.1091/mbc.e06-04-0319.
- [142] P.-F. Cartron, M. Priault, L. Oliver, K. Meflah, S. Manon, et F. M. Vallette, « The N-terminal end of Bax contains a mitochondrial-targeting signal », *J Biol Chem*, vol. 278, n° 13, p. 11633-11641, mars 2003, doi: 10.1074/jbc.M208955200.
- [143] G. Bellot *et al.*, « TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the proapoptotic protein Bax », *Cell Death Differ*, vol. 14, n° 4, Art. n° 4, avr. 2007, doi: 10.1038/sj.cdd.4402055.

- [144] J. Colin, J. Garibal, B. Mignotte, et I. Guénel, « The mitochondrial TOM complex modulates bax-induced apoptosis in *Drosophila* », *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 379, n° 4, p. 939-943, févr. 2009, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.176.
- [145] M. Ott *et al.*, « The mitochondrial TOM complex is required for tBid/Bax-induced cytochrome c release », *J Biol Chem*, vol. 282, n° 38, p. 27633-27639, sept. 2007, doi: 10.1074/jbc.M703155200.
- [146] L. K. Sanjuán Szklarz *et al.*, « Preprotein transport machineries of yeast mitochondrial outer membrane are not required for Bax-induced release of intermembrane space proteins », *J Mol Biol*, vol. 368, n° 1, p. 44-54, avr. 2007, doi: 10.1016/j.jmb.2007.01.016.
- [147] K. Ross, T. Rudel, et V. Kozjak-Pavlovic, « TOM-independent complex formation of Bax and Bak in mammalian mitochondria during TNF α -induced apoptosis », *Cell Death Differ*, vol. 16, n° 5, Art. n° 5, mai 2009, doi: 10.1038/cdd.2008.194.
- [148] L. Lalier, F. Vallette, et S. Manon, « Bcl-2 Family Members and the Mitochondrial Import Machineries: The Roads to Death », *Biomolecules*, vol. 12, n° 2, Art. n° 2, févr. 2022, doi: 10.3390/biom12020162.
- [149] P.-F. Cartron, E. Petit, G. Bellot, L. Oliver, et F. M. Vallette, « Metaxins 1 and 2, two proteins of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery, are essential for Bak activation during TNF alpha triggered apoptosis », *Cellular Signalling*, vol. 26, n° 9, p. 1928-1934, sept. 2014, doi: 10.1016/j.cellsig.2014.04.021.
- [150] I. S. Goping *et al.*, « Regulated Targeting of BAX to Mitochondria », *J Cell Biol*, vol. 143, n° 1, p. 207-215, oct. 1998.
- [151] P.-F. Cartron, « The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients », *Human Molecular Genetics*, vol. 11, n° 6, p. 675-687, mars 2002, doi: 10.1093/hmg/11.6.675.
- [152] S. J. Korsmeyer, J. R. Shutter, D. J. Veis, D. E. Merry, et Z. N. Oltvai, « Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death », *Semin Cancer Biol*, vol. 4, n° 6, p. 327-332, déc. 1993.
- [153] T. P. Garner *et al.*, « An Autoinhibited Dimeric Form of BAX Regulates the BAX Activation Pathway », *Molecular Cell*, vol. 63, n° 3, p. 485-497, août 2016, doi: 10.1016/j.molcel.2016.06.010.
- [154] E. Gavathiotis, D. E. Reyna, M. L. Davis, G. H. Bird, et L. D. Walensky, « BH3-Triggered Structural Reorganization Drives the Activation of Proapoptotic BAX », *Molecular Cell*, vol. 40, n° 3, p. 481-492, nov. 2010, doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.019.
- [155] H. Arokium, N. Camougrand, F. M. Vallette, et S. Manon, « Studies of the Interaction of Substituted Mutants of BAX with Yeast Mitochondria Reveal That the C-terminal Hydrophobic α -Helix Is a Second ART Sequence and Plays a Role in the Interaction with Anti-apoptotic BCL-xL », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, n° 50, p. 52566-52573, déc. 2004, doi: 10.1074/jbc.M408373200.
- [156] P.-F. Cartron, C. Moreau, L. Oliver, E. Mayat, K. Meflah, et F. M. Vallette, « Involvement of the N-terminus of Bax in its intracellular localization and function », *FEBS Letters*, vol. 512, n° 1, p. 95-100, févr. 2002, doi: 10.1016/S0014-5793(02)02227-5.
- [157] H. Arokium, H. Ouerfelli, G. Velours, N. Camougrand, F. M. Vallette, et S. Manon, « Substitutions of potentially phosphorylatable serine residues of Bax reveal how they may regulate its interaction with mitochondria », *J Biol Chem*, vol. 282, n° 48, p. 35104-35112, nov. 2007, doi: 10.1074/jbc.M704891200.
- [158] A. Nechushtan, C. L. Smith, Y. T. Hsu, et R. J. Youle, « Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death », *EMBO J*, vol. 18, n° 9, p. 2330-2341, mai 1999, doi: 10.1093/emboj/18.9.2330.

- [159] S. J. Gardai *et al.*, « Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils », *J Biol Chem*, vol. 279, n° 20, p. 21085-21095, mai 2004, doi: 10.1074/jbc.M400063200.
- [160] M. Xin et X. Deng, « Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation », *J Biol Chem*, vol. 280, n° 11, p. 10781-10789, mars 2005, doi: 10.1074/jbc.M500084200.
- [161] M. Xin *et al.*, « Small-molecule Bax agonists for cancer therapy », *Nat Commun*, vol. 5, p. 4935, sept. 2014, doi: 10.1038/ncomms5935.
- [162] L. Simonyan *et al.*, « Regulation of Bax/mitochondria interaction by AKT », *FEBS Lett*, vol. 590, n° 1, p. 13-21, janv. 2016, doi: 10.1002/1873-3468.12030.
- [163] J. Kale *et al.*, « Phosphorylation switches Bax from promoting to inhibiting apoptosis thereby increasing drug resistance », *EMBO Rep*, vol. 19, n° 9, p. e45235, sept. 2018, doi: 10.15252/embr.201745235.
- [164] P.-F. Cartron, H. Arokium, L. Oliver, K. Meflah, S. Manon, et F. M. Vallette, « Distinct Domains Control the Addressing and the Insertion of Bax into Mitochondria », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, n° 11, p. 10587-10598, mars 2005, doi: 10.1074/jbc.M409714200.
- [165] L. Simonyan *et al.*, « The substitution of Proline 168 favors Bax oligomerization and stimulates its interaction with LUVs and mitochondria », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1859, n° 6, p. 1144-1155, juin 2017, doi: 10.1016/j.bbamem.2017.03.010.
- [166] A. Schinzel, T. Kaufmann, M. Schuler, J. Martinalbo, D. Grubb, et C. Borner, « Conformational control of Bax localization and apoptotic activity by Pro168 », *Journal of Cell Biology*, vol. 164, n° 7, p. 1021-1032, mars 2004, doi: 10.1083/jcb.200309013.
- [167] B. Schellenberg *et al.*, « Bax Exists in a Dynamic Equilibrium between the Cytosol and Mitochondria to Control Apoptotic Priming », *Molecular Cell*, vol. 49, n° 5, p. 959-971, mars 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.022.
- [168] Q. Xu et J. C. Reed, « Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast », *Mol Cell*, vol. 1, n° 3, p. 337-346, févr. 1998, doi: 10.1016/s1097-2765(00)80034-9.
- [169] D. Rojas-Rivera et C. Hetz, « TMBIM protein family: ancestral regulators of cell death », *Oncogene*, vol. 34, n° 3, p. 269-280, janv. 2015, doi: 10.1038/onc.2014.6.
- [170] S. Büttner *et al.*, « A yeast BH3-only protein mediates the mitochondrial pathway of apoptosis », *EMBO J*, vol. 30, n° 14, p. 2779-2792, juin 2011, doi: 10.1038/emboj.2011.197.
- [171] S. Manon, « Yeast as a tool to decipher the molecular mechanisms underlying the functions of Bcl-2 family », *Explor Target Antitumor Ther*, vol. 3, n° 2, p. 128-148, 2022, doi: 10.37349/etat.2022.00076.
- [172] Y.-T. Hsu et R. J. Youle, « Nonionic Detergents Induce Dimerization among Members of the Bcl-2 Family », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, n° 21, p. 13829-13834, mai 1997, doi: 10.1074/jbc.272.21.13829.
- [173] F. W. Peyerl *et al.*, « Elucidation of some Bax conformational changes through crystallization of an antibody-peptide complex », *Cell Death Differ*, vol. 14, n° 3, p. 447-452, mars 2007, doi: 10.1038/sj.cdd.4402025.
- [174] J. A. Yethon, R. F. Epan, B. Leber, R. M. Epan, et D. W. Andrews, « Interaction with a Membrane Surface Triggers a Reversible Conformational Change in Bax Normally Associated with Induction of Apoptosis », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n° 49, p. 48935-48941, déc. 2003, doi: 10.1074/jbc.M306289200.
- [175] P.-F. Cartron, M. Priault, L. Oliver, K. Meflah, S. Manon, et F. M. Vallette, « The N-terminal End of Bax Contains a Mitochondrial-targeting Signal * », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n° 13, p. 11633-11641, mars 2003, doi: 10.1074/jbc.M208955200.

- [176] P.-F. Cartron, G. Bellot, L. Oliver, X. Grandier-Vazeille, S. Manon, et F. M. Vallette, « Bax inserts into the mitochondrial outer membrane by different mechanisms », *FEBS Letters*, vol. 582, n° 20, p. 3045-3051, sept. 2008, doi: 10.1016/j.febslet.2008.07.047.
- [177] J. C. Sharpe, D. Arnoult, et R. J. Youle, « Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members », *Biochim Biophys Acta*, vol. 1644, n° 2-3, p. 107-113, mars 2004, doi: 10.1016/j.bbamcr.2003.10.016.
- [178] L. Scorrano *et al.*, « BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis », *Science*, vol. 300, n° 5616, p. 135-139, avr. 2003, doi: 10.1126/science.1081208.
- [179] P. E. Czabotar *et al.*, « Bax Crystal Structures Reveal How BH3 Domains Activate Bax and Nucleate Its Oligomerization to Induce Apoptosis », *Cell*, vol. 152, n° 3, p. 519-531, janv. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2012.12.031.
- [180] L. D. Walensky *et al.*, « A Stapled BID BH3 Helix Directly Binds and Activates BAX », *Molecular Cell*, vol. 24, n° 2, p. 199-210, oct. 2006, doi: 10.1016/j.molcel.2006.08.020.
- [181] E. Gavathiotis *et al.*, « BAX activation is initiated at a novel interaction site », *Nature*, vol. 455, n° 7216, p. 1076-1081, oct. 2008, doi: 10.1038/nature07396.
- [182] A. Strasser et D. L. Vaux, « Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer », *Molecular Cell*, vol. 78, n° 6, p. 1045-1054, juin 2020, doi: 10.1016/j.molcel.2020.05.014.
- [183] D. E. Reyna *et al.*, « Direct Activation of BAX by BTSA1 Overcomes Apoptosis Resistance in Acute Myeloid Leukemia », *Cancer Cell*, vol. 32, n° 4, p. 490-505.e10, oct. 2017, doi: 10.1016/j.ccell.2017.09.001.
- [184] A. Z. Spitz et E. Gavathiotis, « Physiological and pharmacological modulation of BAX », *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 43, n° 3, p. 206-220, mars 2022, doi: 10.1016/j.tips.2021.11.001.
- [185] S. N. Willis *et al.*, « Apoptosis Initiated When BH3 Ligands Engage Multiple Bcl-2 Homologs, Not Bax or Bak », *Science*, vol. 315, n° 5813, p. 856-859, févr. 2007, doi: 10.1126/science.1133289.
- [186] K. Huang *et al.*, « BH3-only proteins target BCL-xL/MCL-1, not BAX/BAK, to initiate apoptosis », *Cell Res*, vol. 29, n° 11, p. 942-952, nov. 2019, doi: 10.1038/s41422-019-0231-y.
- [187] F. Gautier *et al.*, « Bax Activation by Engagement with, Then Release from, the BH3 Binding Site of Bcl-x_L », *Molecular and Cellular Biology*, vol. 31, n° 4, p. 832-844, févr. 2011, doi: 10.1128/MCB.00161-10.
- [188] E. V. Pavlov *et al.*, « A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast », *J Cell Biol*, vol. 155, n° 5, p. 725-731, nov. 2001, doi: 10.1083/jcb.200107057.
- [189] L. M. Dejean *et al.*, « Oligomeric Bax Is a Component of the Putative Cytochrome c Release Channel MAC, Mitochondrial Apoptosis-induced Channel », *MBoC*, vol. 16, n° 5, p. 2424-2432, mai 2005, doi: 10.1091/mbc.e04-12-1111.
- [190] S. Manon, B. Chaudhuri, et M. Guérin, « Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-x_L », *FEBS Letters*, vol. 415, n° 1, p. 29-32, 1997, doi: 10.1016/S0014-5793(97)01087-9.
- [191] J. M. Jürgensmeier, Z. Xie, Q. Deveraux, L. Ellerby, D. Bredesen, et J. C. Reed, « Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, n° 9, p. 4997-5002, avr. 1998, doi: 10.1073/pnas.95.9.4997.
- [192] M. G. Annis *et al.*, « Bax forms multispansing monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis », *The EMBO Journal*, vol. 24, n° 12, p. 2096-2103, juin 2005, doi: 10.1038/sj.emboj.7600675.
- [193] S. Martinez-Caballero, L. M. Dejean, M. S. Kinnally, K. J. Oh, C. A. Mannella, et K. W. Kinnally, « Assembly of the Mitochondrial Apoptosis-induced Channel, MAC* », *Journal of*

- Biological Chemistry*, vol. 284, n° 18, p. 12235-12245, mai 2009, doi: 10.1074/jbc.M806610200.
- [194] D. Westphal *et al.*, « Apoptotic pore formation is associated with in-plane insertion of Bak or Bax central helices into the mitochondrial outer membrane », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 111, n° 39, sept. 2014, doi: 10.1073/pnas.1415142111.
- [195] S. Bleicken, G. Jeschke, C. Stegmüller, R. Salvador-Gallego, A. J. García-Sáez, et E. Bordignon, « Structural Model of Active Bax at the Membrane », *Molecular Cell*, vol. 56, n° 4, p. 496-505, nov. 2014, doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.022.
- [196] K. Cosentino et A. J. García-Sáez, « Bax and Bak Pores: Are We Closing the Circle? », *Trends Cell Biol*, vol. 27, n° 4, p. 266-275, avr. 2017, doi: 10.1016/j.tcb.2016.11.004.
- [197] T.-C. Sung *et al.*, « Solution Structure of Apoptotic BAX Oligomer: Oligomerization Likely Precedes Membrane Insertion », *Structure*, vol. 23, n° 10, p. 1878-1888, oct. 2015, doi: 10.1016/j.str.2015.07.013.
- [198] T. Moldoveanu et P. E. Czabotar, « BAX, BAK, and BOK: A Coming of Age for the BCL-2 Family Effector Proteins », *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 12, n° 4, p. a036319, janv. 2020, doi: 10.1101/cshperspect.a036319.
- [199] A. S. Spirin, V. I. Baranov, L. A. Ryabova, S. Ovodov, et Y. B. Alakhov, « A Continuous Cell-Free Translation System Capable of Producing Polypeptides in High Yield », *Science*, vol. 242, n° 4882, p. 1162-1164, nov. 1988, doi: 10.1126/science.3055301.
- [200] K. Madin, T. Sawasaki, T. Ogasawara, et Y. Endo, « A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: Plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, n° 2, p. 559-564, janv. 2000, doi: 10.1073/pnas.97.2.559.
- [201] T. Kigawa *et al.*, « Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins », *FEBS Letters*, vol. 442, n° 1, p. 15-19, janv. 1999, doi: 10.1016/S0014-5793(98)01620-2.
- [202] S. Yokoyama, « Protein expression systems for structural genomics and proteomics », *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 7, n° 1, p. 39-43, févr. 2003, doi: 10.1016/S1367-5931(02)00019-4.
- [203] D. Schwarz *et al.*, « Preparative scale expression of membrane proteins in Escherichia coli-based continuous exchange cell-free systems », *Nat Protoc*, vol. 2, n° 11, Art. n° 11, nov. 2007, doi: 10.1038/nprot.2007.426.
- [204] R.-B. Rues, E. Henrich, C. Boland, M. Caffrey, et F. Bernhard, « Cell-Free Production of Membrane Proteins in Escherichia coli Lysates for Functional and Structural Studies », *Methods Mol Biol*, vol. 1432, p. 1-21, 2016, doi: 10.1007/978-1-4939-3637-3_1.
- [205] N. E. Gregorio, M. Z. Levine, et J. P. Oza, « A User's Guide to Cell-Free Protein Synthesis », *Methods and Protocols*, vol. 2, n° 1, Art. n° 1, mars 2019, doi: 10.3390/mps2010024.
- [206] R. Q. Notti et T. Walz, « Native-like environments afford novel mechanistic insights into membrane proteins », *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 47, n° 7, p. 561-569, juill. 2022, doi: 10.1016/j.tibs.2022.02.008.
- [207] A. M. Seddon, P. Curnow, et P. J. Booth, « Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera », *Biochim Biophys Acta*, vol. 1666, n° 1-2, p. 105-117, nov. 2004, doi: 10.1016/j.bbamem.2004.04.011.
- [208] T. H. Bayburt, Y. V. Grinkova, et S. G. Sligar, « Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins », *Nano Lett.*, vol. 2, n° 8, p. 853-856, août 2002, doi: 10.1021/nl025623k.
- [209] I. G. Denisov, Y. V. Grinkova, A. A. Lazarides, et S. G. Sligar, « Directed Self-Assembly of Monodisperse Phospholipid Bilayer Nanodiscs with Controlled Size », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, n° 11, p. 3477-3487, mars 2004, doi: 10.1021/ja0393574.

- [210] S. G. Sligar et I. G. Denisov, « Nanodiscs: A toolkit for membrane protein science », *Protein Science*, vol. 30, n° 2, p. 297-315, févr. 2021, doi: 10.1002/pro.3994.
- [211] G. Fan *et al.*, « Conformational motions and ligand-binding underlying gating and regulation in IP3R channel », *Nat Commun*, vol. 13, n° 1, Art. n° 1, nov. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-34574-1.
- [212] L. Unger, A. Ronco-Campaña, P. Kitchen, R. M. Bill, et A. J. Rothnie, « Biological insights from SMA-extracted proteins », *Biochem Soc Trans*, vol. 49, n° 3, p. 1349-1359, juin 2021, doi: 10.1042/BST20201067.
- [213] I. G. Denisov et S. G. Sligar, « Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins », *Nat Struct Mol Biol*, vol. 23, n° 6, Art. n° 6, juin 2016, doi: 10.1038/nsmb.3195.
- [214] M. Li et G. L. Hazelbauer, « Selective allosteric coupling in core chemotaxis signaling complexes », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, n° 45, p. 15940-15945, nov. 2014, doi: 10.1073/pnas.1415184111.
- [215] S. K. Dondapati, D. A. Wüstenhagen, et S. Kubick, « Functional Analysis of Membrane Proteins Produced by Cell-Free Translation », in *Protein Engineering: Methods and Protocols*, U. T. Bornscheuer et M. Höhne, Éd., in *Methods in Molecular Biology*. , New York, NY: Springer, 2018, p. 171-186. doi: 10.1007/978-1-4939-7366-8_10.
- [216] C. W. Koo, J. M. Hershewe, M. C. Jewett, et A. C. Rosenzweig, « Cell-Free Protein Synthesis of Particulate Methane Monooxygenase into Nanodiscs », *ACS Synth Biol*, vol. 11, n° 12, p. 4009-4017, déc. 2022, doi: 10.1021/acssynbio.2c00366.
- [217] A. Rouchidane Eytayo, M.-F. Giraud, L. Daury, O. Lambert, C. Gonzalez, et S. Manon, « Cell-free synthesis and reconstitution of Bax in nanodiscs: Comparison between wild-type Bax and a constitutively active mutant », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1865, n° 1, p. 184075, janv. 2023, doi: 10.1016/j.bbamem.2022.184075.
- [218] L. Lalier *et al.*, « Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis », *Apoptosis*, vol. 12, n° 5, p. 887-896, mai 2007, doi: 10.1007/s10495-007-0749-1.
- [219] Z.-J. Shen, S. Esnault, A. Schinzel, C. Borner, et J. S. Malter, « The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 facilitates cytokine-induced survival of eosinophils by suppressing Bax activation », *Nat Immunol*, vol. 10, n° 3, p. 257-265, mars 2009, doi: 10.1038/ni.1697.
- [220] S. N. Willis et J. M. Adams, « Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis », *Curr Opin Cell Biol*, vol. 17, n° 6, p. 617-625, déc. 2005, doi: 10.1016/j.ceb.2005.10.001.
- [221] B. Leber, J. Lin, et D. W. Andrews, « Embedded together: The life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes », *Apoptosis*, vol. 12, n° 5, p. 897-911, mai 2007, doi: 10.1007/s10495-007-0746-4.
- [222] E. Er, L. Oliver, P.-F. Cartron, P. Juin, S. Manon, et F. M. Vallette, « Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1757, n° 9, p. 1301-1311, sept. 2006, doi: 10.1016/j.bbabbio.2006.05.032.
- [223] A. Shamas-Din, H. Brahmhatt, B. Leber, et D. W. Andrews, « BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis », *Biochim Biophys Acta*, vol. 1813, n° 4, p. 508-520, avr. 2011, doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.11.024.
- [224] A. Ashkenazi, W. J. Fairbrother, J. D. Levenson, et A. J. Souers, « From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 16, n° 4, p. 273-284, avr. 2017, doi: 10.1038/nrd.2016.253.
- [225] M. A. Dengler, L. Gibson, et J. M. Adams, « BAX mitochondrial integration is regulated allosterically by its $\alpha 1$ - $\alpha 2$ loop », *Cell Death Differ*, vol. 28, n° 12, p. 3270-3281, déc. 2021, doi: 10.1038/s41418-021-00815-x.
- [226] M. A. Frohman, « Role of mitochondrial lipids in guiding fission and fusion », *J Mol Med (Berl)*, vol. 93, n° 3, p. 263-269, mars 2015, doi: 10.1007/s00109-014-1237-z.

- [227] A. Shamas-Din, J. Kale, B. Leber, et D. W. Andrews, « Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 5, n° 4, p. a008714-a008714, avr. 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a008714.
- [228] A. Letai, « Puma strikes Bax », *Journal of Cell Biology*, vol. 185, n° 2, p. 189-191, avr. 2009, doi: 10.1083/jcb.200903134.
- [229] R. Peng *et al.*, « Targeting Bax interaction sites reveals that only homo-oligomerization sites are essential for its activation », *Cell Death Differ*, vol. 20, n° 5, p. 744-754, mai 2013, doi: 10.1038/cdd.2013.4.
- [230] S. C. Ruffolo *et al.*, « BID-dependent and BID-independent pathways for BAX insertion into mitochondria », *Cell Death Differ*, vol. 7, n° 11, p. 1101-1108, nov. 2000, doi: 10.1038/sj.cdd.4400739.
- [231] T. Kuwana *et al.*, « Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane », *Cell*, vol. 111, n° 3, p. 331-342, nov. 2002, doi: 10.1016/s0092-8674(02)01036-x.
- [232] X. Roucou, T. Rostovtseva, S. Montessuit, J.-C. Martinou, et B. Antonsson, « Bid induces cytochrome c-impermeable Bax channels in liposomes », 2002.
- [233] L. M. Real Hernandez et I. Levental, « Lipid packing is disrupted in copolymeric nanodiscs compared with intact membranes », *Biophysical Journal*, vol. 122, n° 11, p. 2256-2266, juin 2023, doi: 10.1016/j.bpj.2023.01.013.
- [234] B. Schafer *et al.*, « Mitochondrial Outer Membrane Proteins Assist Bid in Bax-mediated Lipidic Pore Formation », *MBoC*, vol. 20, n° 8, p. 2276-2285, avr. 2009, doi: 10.1091/mbc.e08-10-1056.
- [235] K. Tremblais, L. Oliver, P. Juin, M. Thérèse Le Cabellec, K. Meflah, et F. M. Vallette, « The C-Terminus of bax Is Not a Membrane Addressing/Anchoring Signal », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 260, n° 3, p. 582-591, juill. 1999, doi: 10.1006/bbrc.1999.0904.
- [236] S. Matsuyama, Q. Xu, J. Velours, et J. C. Reed, « The Mitochondrial F0F1-ATPase Proton Pump Is Required for Function of the Proapoptotic Protein Bax in Yeast and Mammalian Cells », *Molecular Cell*, vol. 1, n° 3, p. 327-336, févr. 1998, doi: 10.1016/S1097-2765(00)80033-7.
- [237] Y. Fujiki, A. L. Hubbard, S. Fowler, et P. B. Lazarow, « Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum », *J Cell Biol*, vol. 93, n° 1, p. 97-102, avr. 1982, doi: 10.1083/jcb.93.1.97.
- [238] K. Lee, M. Ikura, et C. B. Marshall, « The Self-Association of the KRAS4b Protein is Altered by Lipid-Bilayer Composition and Electrostatics », *Angew Chem Int Ed*, vol. 62, n° 18, p. e202218698, avr. 2023, doi: 10.1002/anie.202218698.
- [239] T. T. Renault *et al.*, « The cytosolic domain of human Tom22 modulates human Bax mitochondrial translocation and conformation in yeast », *FEBS Lett*, vol. 586, n° 2, p. 116-121, janv. 2012, doi: 10.1016/j.febslet.2011.12.003.
- [240] T. Kuwana *et al.*, « Mitochondrial residence of the apoptosis inducer BAX is more important than BAX oligomerization in promoting membrane permeabilization », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 295, n° 6, p. 1623-1636, févr. 2020, doi: 10.1074/jbc.RA119.011635.
- [241] G. Heimlich *et al.*, « Bax-induced cytochrome c release from mitochondria depends on alpha-helices-5 and -6. », *Biochem J*, vol. 378, n° Pt 1, p. 247-255, févr. 2004, doi: 10.1042/BJ20031152.
- [242] D. Martin *et al.*, « The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies », *Oncotarget*, vol. 5, n° 19, p. 8906-8923, oct. 2014, doi: 10.18632/oncotarget.2417.

- [243] C. Grathwohl et K. Wüthrich, « Nmr studies of the rates of proline *cis* - *trans* isomerization in oligopeptides: RATES OF *CIS* - *TRANS* ISOMERIZATION », *Biopolymers*, vol. 20, n° 12, p. 2623-2633, déc. 1981, doi: 10.1002/bip.1981.360201209.
- [244] S. Cory et J. M. Adams, « The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch », *Nat Rev Cancer*, vol. 2, n° 9, Art. n° 9, sept. 2002, doi: 10.1038/nrc883.
- [245] L. Iommarini, A. Ghelli, G. Gasparre, et A. M. Porcelli, « Mitochondrial metabolism and energy sensing in tumor progression », *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, vol. 1858, n° 8, p. 582-590, août 2017, doi: 10.1016/j.bbabi.2017.02.006.
- [246] C. S. Palmer, A. J. Anderson, et D. Stojanovski, « Mitochondrial protein import dysfunction: mitochondrial disease, neurodegenerative disease and cancer », *FEBS Lett*, vol. 595, n° 8, p. 1107-1131, avr. 2021, doi: 10.1002/1873-3468.14022.
- [247] N. Yan et Y. Shi, « MECHANISMS OF APOPTOSIS THROUGH STRUCTURAL BIOLOGY », 2005.
- [248] P.-F. Cartron, M. Priault, L. Oliver, K. Meflah, S. Manon, et F. M. Vallette, « The N-terminal End of Bax Contains a Mitochondrial-targeting Signal * », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n° 13, p. 11633-11641, mars 2003, doi: 10.1074/jbc.M208955200.
- [249] A. Shamas-Din *et al.*, « Multiple partners can kiss-and-run: Bax transfers between multiple membranes and permeabilizes those primed by tBid », *Cell Death Dis*, vol. 5, n° 6, p. e1277-e1277, juin 2014, doi: 10.1038/cddis.2014.234.
- [250] D. Hockenbery, G. Nuñez, C. Millman, R. D. Schreiber, et S. J. Korsmeyer, « Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death », *Nature*, vol. 348, n° 6299, p. 334-336, nov. 1990, doi: 10.1038/348334a0.
- [251] M. González-García *et al.*, « bcl-xL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria ».
- [252] O. Tejjido et L. Dejean, « Upregulation of Bcl2 inhibits apoptosis-driven BAX insertion but favors BAX relocalization in mitochondria », *FEBS Letters*, vol. 584, n° 15, p. 3305-3310, août 2010, doi: 10.1016/j.febslet.2010.07.002.
- [253] Y. Yao *et al.*, « Characterization of the membrane-inserted C-terminus of cytoprotective BCL-XL », *Protein Expression and Purification*, vol. 122, p. 56-63, juin 2016, doi: 10.1016/j.pep.2016.02.010.
- [254] D. Garenne, T. Renault, et S. Manon, « Bax mitochondrial relocation is linked to its phosphorylation and its interaction with Bcl-xL », *Microb Cell*, vol. 3, n° 12, p. 597-605, déc. 2016, doi: 10.15698/mic2016.12.547.
- [255] S.-Y. Jeong *et al.*, « Bcl-xL sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers », *EMBO J*, vol. 23, n° 10, p. 2146-2155, mai 2004, doi: 10.1038/sj.emboj.7600225.
- [256] J. Ding *et al.*, « After Embedding in Membranes Antiapoptotic Bcl-XL Protein Binds Both Bcl-2 Homology Region 3 and Helix 1 of Proapoptotic Bax Protein to Inhibit Apoptotic Mitochondrial Permeabilization », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, n° 17, p. 11873-11896, avr. 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.552562.
- [257] D. S. Potter et A. Letai, « To Prime, or Not to Prime: That Is the Question », *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, vol. 81, p. 131-140, janv. 2016, doi: 10.1101/sqb.2016.81.030841.
- [258] J. Deng, N. Carlson, K. Takeyama, P. Dal Cin, M. Shipp, et A. Letai, « BH3 Profiling Identifies Three Distinct Classes of Apoptotic Blocks to Predict Response to ABT-737 and Conventional Chemotherapeutic Agents », *Cancer Cell*, vol. 12, n° 2, p. 171-185, août 2007, doi: 10.1016/j.ccr.2007.07.001.
- [259] J. Pécot *et al.*, « Tight Sequestration of BH3 Proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes Contributes to Apoptotic Resistance », *Cell Reports*, vol. 17, n° 12, p. 3347-3358, déc. 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.064.

- [260] C. Binder, D. Marx, L. Binder, A. Schauer, et W. Hiddemann, « Expression of Bax in relation to Bcl-2 and other predictive parameters in breast cancer », *Ann Oncol*, vol. 7, n° 2, p. 129-133, févr. 1996, doi: 10.1093/oxfordjournals.annonc.a010538.
- [261] L. Tang *et al.*, « Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma », *Clin Cancer Res*, vol. 4, n° 8, p. 1865-1871, août 1998.
- [262] R. Salvador-Gallego *et al.*, « Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores », *The EMBO Journal*, vol. 35, n° 4, p. 389-401, févr. 2016, doi: 10.15252/embj.201593384.
- [263] L. Große, C. A. Wurm, C. Brüser, D. Neumann, D. C. Jans, et S. Jakobs, « Bax assembles into large ring-like structures remodeling the mitochondrial outer membrane in apoptosis », *The EMBO Journal*, vol. 35, n° 4, p. 402-413, févr. 2016, doi: 10.15252/embj.201592789.
- [264] S. Montessuit, G. Mazzei, E. Magnenat, et B. Antonsson, « Expression and Purification of Full-Length Human Bax α », *Protein Expression and Purification*, vol. 15, n° 2, p. 202-206, mars 1999, doi: 10.1006/prev.1998.1010.
- [265] S. Lewis, S. S. Bethell, S. Patel, J.-C. Martinou, et B. Antonsson, « Purification and Biochemical Properties of Soluble Recombinant Human Bax », *Protein Expression and Purification*, vol. 13, n° 1, p. 120-126, juin 1998, doi: 10.1006/prev.1997.0871.
- [266] B. Antonsson, S. Montessuit, S. Lauper, R. Eskes, et J.-C. Martinou, « Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria », 2000.
- [267] J. M. Pettersen, Y. Yang, et A. S. Robinson, « Advances in nanodisc platforms for membrane protein purification », *Trends in Biotechnology*, vol. 41, n° 8, p. 1041-1054, août 2023, doi: 10.1016/j.tibtech.2023.02.006.
- [268] M. Priault, P.-F. Cartron, N. Camougrand, B. Antonsson, F. M. Vallette, et S. Manon, « Investigation of the role of the C-terminus of Bax and of tc-Bid on Bax interaction with yeast mitochondria », *Cell Death Differ*, vol. 10, n° 9, p. 1068-1077, sept. 2003, doi: 10.1038/sj.cdd.4401270.
- [269] N. Shadiac, Y. Nagarajan, S. Waters, et M. Hrmova, « Close allies in membrane protein research: Cell-free synthesis and nanotechnology », *Molecular Membrane Biology*, vol. 30, n° 3, p. 229-245, mai 2013, doi: 10.3109/09687688.2012.762125.
- [270] O. Rauh, K. Kukovetz, L. Winterstein, B. Introini, et G. Thiel, « Chapter Twelve - Combining in vitro translation with nanodisc technology and functional reconstitution of channels in planar lipid bilayers », in *Methods in Enzymology*, vol. 652, D. L. Minor et H. M. Colecraft, Éd., in *Ion Channels: Channel Biochemistry, Reconstitution, and Function*, vol. 652, Academic Press, 2021, p. 293-318. doi: 10.1016/bs.mie.2021.02.003.
- [271] N. Skar-Gislinge *et al.*, « Elliptical Structure of Phospholipid Bilayer Nanodiscs Encapsulated by Scaffold Proteins: Casting the Roles of the Lipids and the Protein », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, n° 39, p. 13713-13722, oct. 2010, doi: 10.1021/ja1030613.
- [272] A. Y. Shih, I. G. Denisov, J. C. Phillips, S. G. Sligar, et K. Schulten, « Molecular Dynamics Simulations of Discoidal Bilayers Assembled from Truncated Human Lipoproteins », *Biophysical Journal*, vol. 88, n° 1, p. 548-556, janv. 2005, doi: 10.1529/biophysj.104.046896.
- [273] X.-P. Xu *et al.*, « Three-dimensional structure of Bax-mediated pores in membrane bilayers », *Cell Death Dis*, vol. 4, n° 6, Art. n° 6, juin 2013, doi: 10.1038/cddis.2013.210.
- [274] C. A. López, M. F. Swift, X.-P. Xu, D. Hanein, N. Volkmann, et S. Gnanakaran, « Biophysical Characterization of a Nanodisc with and without BAX: An Integrative Study Using Molecular Dynamics Simulations and Cryo-EM », *Structure*, vol. 27, n° 6, p. 988-999.e4, juin 2019, doi: 10.1016/j.str.2019.03.013.
- [275] Y.-C. Lai, C.-C. Li, T.-C. Sung, C.-W. Chang, Y.-J. Lan, et Y.-W. Chiang, « The role of cardiolipin in promoting the membrane pore-forming activity of BAX oligomers », *Biochim*

- Biophys Acta Biomembr*, vol. 1861, n° 1, p. 268-280, janv. 2019, doi: 10.1016/j.bbamem.2018.06.014.
- [276] L. A. Clifton, H. P. Wacklin-Knecht, J. Ádén, A. U. Mushtaq, T. Sparrman, et G. Gröbner, « Creation of distinctive Bax-lipid complexes at mitochondrial membrane surfaces drives pore formation to initiate apoptosis », *Sci Adv*, vol. 9, n° 22, p. eadg7940, juin 2023, doi: 10.1126/sciadv.adg7940.
- [277] M. Colombini, « Ceramide channels and mitochondrial outer membrane permeability », *J Bioenerg Biomembr*, vol. 49, n° 1, p. 57-64, févr. 2017, doi: 10.1007/s10863-016-9646-z.
- [278] G. Guihard *et al.*, « The Mitochondrial Apoptosis-induced Channel (MAC) Corresponds to a Late Apoptotic Event », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, n° 45, p. 46542-46550, nov. 2004, doi: 10.1074/jbc.M405153200.
- [279] C. Adrain, « Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2 », *The EMBO Journal*, vol. 20, n° 23, p. 6627-6636, déc. 2001, doi: 10.1093/emboj/20.23.6627.
- [280] G. Ichim *et al.*, « Limited Mitochondrial Permeabilization Causes DNA Damage and Genomic Instability in the Absence of Cell Death », *Molecular Cell*, vol. 57, n° 5, p. 860-872, mars 2015, doi: 10.1016/j.molcel.2015.01.018.
- [281] K. McArthur *et al.*, « BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis », *Science*, vol. 359, n° 6378, p. eaao6047, févr. 2018, doi: 10.1126/science.aao6047.
- [282] K. Cosentino *et al.*, « The interplay between BAX and BAK tunes apoptotic pore growth to control mitochondrial-DNA-mediated inflammation », *Molecular Cell*, vol. 82, n° 5, p. 933-949.e9, mars 2022, doi: 10.1016/j.molcel.2022.01.008.
- [283] E. Gavathiotis *et al.*, « BAX activation is initiated at a novel interaction site », *Nature*, vol. 455, n° 7216, Art. n° 7216, oct. 2008, doi: 10.1038/nature07396.
- [284] M. Daniilidis, M. J. Brandl, et F. Hagn, « The Advanced Properties of Circularized MSP Nanodiscs Facilitate High-resolution NMR Studies of Membrane Proteins », *J Mol Biol*, vol. 434, n° 24, p. 167861, déc. 2022, doi: 10.1016/j.jmb.2022.167861.
- [285] H. Liu et J. H. Naismith, « An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol », *BMC Biotechnol*, vol. 8, p. 91, déc. 2008, doi: 10.1186/1472-6750-8-91.
- [286] L. A. Compton et W. C. Johnson, « Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication », *Analytical Biochemistry*, vol. 155, n° 1, p. 155-167, mai 1986, doi: 10.1016/0003-2697(86)90241-1.
- [287] J. G. Lees, A. J. Miles, F. Wien, et B. A. Wallace, « A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space », *Bioinformatics*, vol. 22, n° 16, p. 1955-1962, août 2006, doi: 10.1093/bioinformatics/btl327.
- [288] S. Yuan et C. W. Akey, « Apoptosome Structure, Assembly, and Procaspase Activation », *Structure*, vol. 21, n° 4, p. 501-515, avr. 2013, doi: 10.1016/j.str.2013.02.024.
- [289] A. M. Verhagen, E. J. Coulson, et D. L. Vaux, « Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs », *Genome Biol*, vol. 2, n° 7, Art. n° 7, juill. 2001, doi: 10.1186/gb-2001-2-7-reviews3009.
- [290] T. T. Renault et S. Manon, « Bax: Addressed to kill », *Biochimie*, vol. 93, n° 9, p. 1379-1391, sept. 2011, doi: 10.1016/j.biochi.2011.05.013.
- [291] A. Y. Robin *et al.*, « Ensemble Properties of Bax Determine Its Function », *Structure*, vol. 26, n° 10, p. 1346-1359.e5, oct. 2018, doi: 10.1016/j.str.2018.07.006.
- [292] P. E. Czabotar, P. M. Colman, et D. C. S. Huang, « Bax activation by Bim? », *Cell Death Differ*, vol. 16, n° 9, Art. n° 9, sept. 2009, doi: 10.1038/cdd.2009.83.

- [293] J. Su *et al.*, « Structural basis of Tom20 and Tom22 cytosolic domains as the human TOM complex receptors », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 119, n° 26, p. e2200158119, juin 2022, doi: 10.1073/pnas.2200158119.
- [294] I. T. Desta, K. A. Porter, B. Xia, D. Kozakov, et S. Vajda, « Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking », *Structure*, vol. 28, n° 9, p. 1071-1081.e3, sept. 2020, doi: 10.1016/j.str.2020.06.006.

Publications en rapport avec la thèse



Cell-free synthesis and reconstitution of Bax in nanodiscs: Comparison between wild-type Bax and a constitutively active mutant

Akandé Rouchidane Eyitayo^a, Marie-France Giraud^{a,b}, Laetitia Daury^b, Olivier Lambert^b, Cécile Gonzalez^{a,*},¹, Stéphen Manon^{a,*}

^a IBGC, UMR5095, CNRS, Université de Bordeaux, France

^b CBMN, UMR5248, CNRS, Université de Bordeaux, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Apoptosis
B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) family
Bax
Nanodiscs
Liposomes
electron microscopy (EM)

ABSTRACT

Bax is a major player in the mitochondrial pathway of apoptosis, by making the Outer Mitochondrial Membrane (OMM) permeable to various apoptogenic factors, including cytochrome *c*. In order to get further insight into the structure and function of Bax when it is inserted in the OMM, we attempted to reconstitute Bax in nanodiscs. Cell-free protein synthesis in the presence of nanodiscs did not yield Bax-containing nanodiscs, but it provided a simple way to purify full-length Bax without any tag. Purified wild-type Bax (BaxWT) and a constitutively active mutant (BaxP168A) displayed biochemical properties that were in line with previous characterizations following their expression in yeast and human cells followed by their reconstitution into liposomes. Both Bax variants were then reconstituted in nanodiscs. Size exclusion chromatography, dynamic light scattering and transmission electron microscopy showed that nanodiscs formed with BaxP168A were larger than nanodiscs formed with BaxWT. This was consistent with the hypothesis that BaxP168A was reconstituted in nanodiscs as an active oligomer.

1. Introduction

Bcl-2 family members are major regulators of the intrinsic pathway of apoptosis ([1], for review). Among them, the multidomain pro-apoptotic protein Bax is central to the process [2–4]. Bax is present, under an inactive conformation, in the vast majority of non-apoptotic cells. Following an apoptotic signal, Bax is activated and relocalized at the outer mitochondrial membrane (OMM), where it is oligomerized to form a large size pore [5–8]. The formation of this pore promotes the release of several so-called apoptogenic factors, which contribute to the downstream activation of caspases, and other pro-apoptotic factors.

When in solution, Bax is organized in 9 α -helices [9]. Like for anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL, the C-terminal α -helix of Bax, α 9, is hydrophobic and has been first considered as an essential membrane anchor. The membrane anchor function of the C-terminal α -helix of Bcl-

2 or Bcl-xL has been supported by clear evidences [10]. On the contrary, the actual role of the C-terminal α -helix of Bax as a membrane anchor remains discussed. Early *in vitro* experiments on chimeric proteins between Bax and Bcl-xL showed that the C-terminal α -helix of Bax (BaxH α 9) could not serve as an anchor for Bcl-xL, while the C-terminal α -helix of Bcl-xL could serve as a mitochondrial membrane anchor for Bax [11], although the chimera lost its pro-apoptotic properties [12]. The capacity of recombinant Bax Δ H α 9 (Bax without its C-terminal α -helix) to permeabilize liposomes initially showed conflicting results: Montessuit *et al* found that the protein was 25-fold less active than full-length Bax [13], while Saito *et al* found that the protein was fully active [14]. It was further shown that Bax Δ H α 9 was indeed inactive but could be activated, through its oligomerization, by the presence of a small amount of octylglucoside [15]. This suggested that BaxH α 9 was not involved in Bax insertion but rather in the process of Bax

Abbreviations: AEBF, 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride; ANTS, 8-Aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonate; CN-PAGE, Colorless Native PAGE; DLS, Dynamic Light Scattering; DPX, p-Xylene-bis(N-pyridinium bromide); IPTG, Isopropyl β -D-thiogalactoside; LB, Luria-Bertani medium; MLV, Multilamellar Vesicles; MSP1E3D1, Membrane Scaffold Protein; OMM, Outer Mitochondrial Membrane; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; POPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; POPG, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol; SEC, Size Exclusion Chromatography; TB, Terrific Broth; TEM, Transmission Electron Microscopy.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: cecile.gonzalez@univ-lyon1.fr (C. Gonzalez), manon@ibgc.cnrs.fr (S. Manon).

¹ Present address: IBCP, UMR5086, CNRS, Université de Lyon 1, France

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.184075>

Received 24 June 2022; Received in revised form 11 October 2022; Accepted 16 October 2022

Available online 20 October 2022

0005-2736/© 2022 Published by Elsevier B.V.

oligomerization. BaxH α 9 is very similar to the C-terminal α -helices of both Bcl-2 and Bcl-xL; however, both anti-apoptotic proteins have positively charged residues upstream their C-terminal α -helix that could help stabilizing inserted proteins, contrary to Bax [10]. Beyond this discussion about its role as a *bona fide* membrane anchor, there is ample additional evidence that BaxH α 9 movements play a role in Bax activation [9,12,15]. Additionally, the residue S184, that is located within BaxH α 9, is the target of several protein-kinases, including the survival kinase AKT [16,17]. The phosphorylation of S184, or the substitution of S184 by a negatively charged residue D or E, has been shown to decrease the mitochondrial localization of Bax in human cells [16,18] and following heterologous expression in yeast cells [19]. Besides, Bax phosphorylation correlated with the resistance to BH3-mimetics in primary cancer cells [18] and, conversely, molecules preventing Bax phosphorylation by interacting with the pocket around S184 did favor Bax activation [20]. It should be noted, however, that the consequences of the phosphorylation of S184 on Bax function are still not completely elucidated, because the phosphorylation of S184 may have additional effects on Bax stability, its interaction with anti-apoptotic partners, and its retrotranslocation [21–23].

Another set of site-directed mutagenesis experiments was done on residue P168, that is located in the loop between H α 8 and H α 9. Due to their greater tendency to adopt the *cis* form, proline residues are more subject to support *cis/trans* isomerization, with possible dramatic consequences on protein conformation [24]. In addition, a peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase, Pin1, is able to interact with Bax and modulate its mitochondrial localization [25]. The substitution of P168 by other residues led to conflicting results. When expressed in human glioblastoma, a P168V mutant displayed an increased mitochondrial localization [26]. A similar effect was observed with a P168A mutant expressed in yeast, associated to a dramatic increase of Bax-induced release of cytochrome c [27]. When synthesized as a recombinant His₆-tagged protein, the same P168A mutant displayed an increased ability (compared to BaxWT) to bind and permeabilize liposomes, yeast mitochondria and human mitochondria (HCT116 Bax^{-/-}), although the increase was less marked than in *in cellulo* experiments [28]. It was hypothesized that the isomerization of P168 could significantly modulate the position of H α 9 between a “closed” position, in the hydrophobic groove formed by the three BH domains (Bcl-2 Homology domains) and an “opened” position, where H α 9 could interact with the lipid bilayer and/or a proteic partner [29]. However, other mutagenesis experiments gave different results. A P168G mutation was shown to stabilize an inactive dimer that remained in the cytosol in MEFs [30]. GFP-BaxP168A or YFP-BaxP168A fusions were also found to remain cytosolic in staurosporin-treated MEFs [31], in mouse FSK7 cells [32] and in human HEK293 cells [33]. It is possible that still undefined other factors, beyond the conformation of Bax itself, are involved in the localization of this mutant. Alternatively, the presence of additional sequences at the N-terminal end (GFP, His₆ tag) or the complete deletion of the mobile N-terminal sequence may modulate conformational changes of the C-terminus: indeed, it has been shown that the activation of Bax could be modulated by an interaction between R9 and D154 [19] and that Bax was strongly activated by the deletion of its 20 N-terminal residues [33].

The structure of full-length soluble monomeric Bax (supposedly inactive) has been solved by NMR and showed the localization of H α 9 in the hydrophobic groove (the “closed” position defined above) [9]. The structure of a Bax dimer obtained after its activation by a peptide covering the BH3 domain of Bid has been solved by X-Ray crystallography, but this structure lacked the H α 9 [34]. The structure of the inactive dimer containing the P168G mutation has also been solved by X-Ray crystallography, showing the H α 9 in the hydrophobic groove [30].

The structure of the full-length and active Bax (forming the pore) is then still missing. Biochemistry experiments [15] suggest that it is an oligomer (260 kDa) containing about 12 Bax monomers (21 kDa). Electrophysiology experiments showed that Bax could form a pore having a size of about 4.6 nm in diameter [6,35], large enough to

permeabilize the membrane to a small protein like cytochrome c (12.5 kDa, ~3 nm). It is noteworthy that the degree of oligomerization may increase with time [36]. The structures obtained by high resolution fluorescence microscopy and atomic force microscopy showed much larger structures, with diameters from 40 to >100 nm [7,8], that are unlikely to be formed during the early steps of apoptosis, when there is a selectivity of released proteins: for example, mature smac/diablo (a 21 kDa protein) is released 4 times more slowly than cytochrome c (12.5 kDa) [37]. Even more strikingly, when expressed in yeast, Bax is able to release cytochrome c but not a cytochrome c-GFP fusion [38]. These observations are thus not compatible with the existence of an unselective pore having a diameter larger than 5 nm.

It is therefore desirable to set up a controlled model of active Bax oligomers, both for biochemical and structural studies. In recent years, nanodiscs have been developed as a powerful environment to study membrane proteins [39]. The diameter of nanodiscs is controlled namely by the size of the scaffold protein [40]. Their stability and relative homogeneity has allowed investigators to get both biochemical and structural data on a large number of membrane proteins [41].

In the present study, we first attempted to use cell-free protein synthesis in the presence of pre-formed nanodiscs to combine the translation and the insertion of Bax into nanodiscs, as it had been done for other membrane proteins [42–44]. This did not work as initially intended, as we observed that the presence of nanodiscs induced a precipitation of Bax. The fact that the precipitation occurred at lower nanodisc concentration for BaxWT than for the BaxP168A mutant suggested that this precipitation was linked to Bax propensity to form oligomers that could not be inserted. Interestingly, nanodisc-induced Bax precipitation could be fully prevented by the co-synthesis with its anti-apoptotic partner Bcl-xL.

In these experiments, Bax precipitation provided the opportunity to quickly produce untagged full-length BaxWT and the constitutively active BaxP168A mutant that were pure enough for further biochemistry assays. Like it was previously shown for the His₆-tagged proteins produced in the presence of low amounts of Brij-58 or F8-TAC [28], the BaxP168A mutant was more active than BaxWT, showing that the difference observed *in cellulo* was conserved on recombinant proteins. Both proteins were further used to co-form Bax-containing nanodiscs. The comparison of the size of nanodiscs formed with BaxWT or with the BaxP168A mutant suggested that the later contained oligomeric active Bax, consistent with previously published electrophysiology and biochemistry experiments on mitochondria-inserted Bax.

2. Experimental procedures

2.1. Membrane Scaffold Protein (His₆-MSP1E3D1) purification

The plasmid pET28b encoding His₆-tagged MSP1E3D1 (Addgene) was transformed into *E.coli* BL21DE3* and plated on LB solid medium (0.5 % Yeast Extract, 1 % Tryptone, 1 % NaCl, 1.5 % Agar) containing 30 mg/L kanamycin. One isolated colony was pre-grown in LB medium containing 30 mg/L kanamycin overnight at 37 °C. The preculture was inoculated into 1 L of TB medium (2.4 % Yeast Extract, 1.2 % Tryptone, 0.5 % glycerol, 8.9 mM Sodium Phosphate buffer pH 7.0) containing 30 mg/L of kanamycin at OD₆₀₀ = 0.02 and allowed to grow until OD₆₀₀ = 0.9. MSP1E3D1 expression was induced by adding 1 mM IPTG, and the growth was extended at 37 °C until OD₆₀₀ reached 1.8. These conditions of expression are standard to produce any recombinant non-toxic soluble protein in BL21DE3* strain. Some adjustments have been tried (O.D., temperature, time) but none significantly improved the yield. Cells were pelleted by centrifugation (4000 xg, 10 min, 4 °C, Sorvall SLA1500 rotor), then resuspended in 30 mL lysis buffer (100 mM Na₂HPO₄, pH 7.6, 50 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM Pic8340 (Proteases inhibitors, Sigma), 1 mM AEBSEF, 1 % Triton X100, one tablet of Complete EDTA-free). Cells were lysed by sonication (50 % pulsation, Power on 7 (max microTip), 7 cycles of 30 s of sonication followed by 30 s pause).

Cells debris were pelleted by centrifugation (46,000 \times g, 30 min, 4 °C, Beckman 45Ti rotor). The supernatant was loaded overnight (in a closed circuit on a peristaltic pump) on a Ni-NTA column (HisTrap FF 5 mL, Cytiva) previously equilibrated in lysis buffer. The circuit was opened and the column was washed with 5 volumes of buffers 1 to 3 (Buffer 1: 40 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 % Triton X100; Buffer 2: 40 mM Tris/HCl pH 8.0; 300 mM NaCl, 50 mM Sodium Cholate; Buffer 3: 40 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole). The column was then connected to an Äkta purifier and washed with one more volume of buffer 3. Proteins were eluted with elution buffer (40 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole). The eluate was then dialyzed against the desalting buffer (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl) and concentrated with a Vivaspin concentrator (10 kDa cut-off, Sartorius). The protein (~7 mg/mL) was stored as working aliquots at -80 °C.

A StrepII-tagged version of MSP1E3D1 was also purified, starting from a pET28b plasmid expressing StrepII-TEV-MSP1E3D1, that was constructed by replacing the His6 tag by a StrepII tag using PCR. The bacterial lysate was obtained as above and was loaded onto a 1 mL Strep-TactinXT-Superflow column (IBA) and connected to an Äkta Purifier. The column was washed with 5 mL of 10 mM Tris/HCl (pH 8.0) containing 150 mM NaCl and 1 mM EDTA, 5 mL of the same buffer added with 1 % Triton X-100, and 5 mL of the same buffer added with 50 mM sodium cholate. The protein was then eluted with 5 mL of the same buffer added with 50 mM biotine. Fractions containing StrepII-TEV-MSP1E3D1 were identified after a SDS-PAGE revealed by Coomassie Blue staining and pooled. They were loaded on a 16/600 Superdex 75 column and Size Exclusion Chromatography (SEC) was done with a 20 mM Tris/HCl buffer (pH 8.0) containing 100 mM NaCl and 1 mM EDTA. The fractions containing the protein were pooled and concentrated with a Vivaspin concentrators (10 kDa cut-off). The protein (~7 mg/mL) was stored as working aliquots at -80 °C.

2.2. Nanodiscs preparation

2.5 mg of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) in chloroform (Anatrace) were dried for 3 h under argon flow. The dry lipid film was resolubilized in nanodisc buffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 200 mM Sodium Cholate). 1.5 mg of the Membrane Scaffold Protein (His6-MSP1E3D1) was added and left for equilibration for 1 h. Detergent was removed by adding 150 mg of BioBeads SM-2 (Bio-Rad) for 3 h. The sample was then centrifuged at 20,000 \times g for 15 min at 4 °C, filtered through a 0.22 μ m membrane and loaded on a SEC column (Superdex 200 10/300GL, GE Healthcare). SEC was run in the same buffer (without cholate) at 0.5 mL per minute. When needed, nanodiscs were concentrated on Vivaspin with a 30 kDa cut-off (final concentration: 0.2 to 0.4 mM MSP1E3D1).

2.3. Bax cell-free synthesis

Human Bax cDNA was cloned in a pIVEX 2.4 plasmid (Roche). The cloning was done so that the His6 tag was absent from the construction. Cell-free protein synthesis [45] was done in a small volume dialysis chamber (100 μ L), separated from a feeding reservoir (1700 μ L) by a dialysis membrane (MW 10,000 Da). The system was routinely set up in an inverted microcentrifuge tube. Both chambers contained 0.1 M K/HEPES (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.05 % Na₃N, 2 % PEG 8000, 151 mM Potassium Acetate, 7.1 mM Magnesium Acetate, 0.1 mg/mL Folinic acid (calcium salt), 2 mM DTT, 1 mM (each) NTP mix, 0.5 mM (each) amino acid mix, 1 mM (each) RDEWCM mix, 20 mM K/PEP, 20 mM acetylphosphate (Li/K salt), protease inhibitors cocktail (Complete without EDTA, Roche). The dialysis chamber was supplemented with components for the synthesis: 35 % (v/v) S30 *E.coli* BL21DE3 lysate (in 10 mM tris-acetate buffer, pH 8.2, 14 mM Magnesium Acetate, 0.6 mM Potassium Acetate, 0.5 mM DTT), 0.04 mg/mL Pyruvate Kinase (Sigma), 15 μ g/mL pIVEX-Bax plasmid, 0.5 mg/mL tRNAs mix (Roche), 6 units/mL

T7 RNA polymerase [46], 3 units/mL RNasin (Promega). Depending on the experiments (see results), preformed nanodiscs were added. The synthesis was done for 16 h at 30 °C under gentle agitation.

The reaction mix was centrifuged for 15 min at 20,000 \times g. In the presence of pre-formed nanodiscs, a large proportion of Bax protein was found in the pellet (see results). Bax was next resolubilized in the presence of Nonidet-P40 or Brij-58 (see results).

2.4. Bax-containing nanodiscs co-formation

2.5 mg of a POPC/POPG 3/1 (w/w) mixture in chloroform (Anatrace) were dried for 3 h under argon flow. The dry lipid film was resolubilized in co-formation buffer (20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 200 mM Sodium Cholate). BaxWT or BaxP168A resolubilized in Brij-58 (see results) were treated on detergent removal spin columns (Pierce) to remove the excess of Brij-58. The protein recovery yield was about 50 %. The rest of the protocol was similar to empty nanodiscs (see above).

The insertion of His₆-BaxWT and His₆-BaxP168A into nanodiscs formed with StrepII-MSP1E3D1 was done by cell-free synthesis in the presence of pre-formed nanodiscs prepared with POPC and StrepII-MSP1E3D1 (see above). Like for the synthesis of untagged Bax in the presence of His₆-MSP1E3D1, a large proportion of Bax was precipitated. Nevertheless, the supernatant containing nanodiscs (0.5 mL) was mixed with StrepII-Tactin sepharose (IBA) and incubated overnight at 4 °C under gentle agitation. Sepharose beads were washed several times with a 100 mM Tris/HCl buffer (pH 8.0) containing 150 mM NaCl and 1 mM EDTA. The elution was done by adding the same buffer containing 50 mM Biotin and incubated overnight at 4 °C under gentle agitation. The supernatant was collected and dialysed against a 20 mM Na/Hepes buffer (pH 7.8) containing 150 mM NaCl. The dialysate was then added to Ni-NTA superflow resin (Qiagen) and incubated overnight at 4 °C under gentle agitation. The resin was washed twice with the same buffer, and the elution was done with the same buffer containing 250 mM imidazole. The eluate was dialyzed against the same buffer without imidazole, and concentrated with Vivaspin concentrators (cut-off 30 kDa).

In all the experiments, Bax preparations were stored at 4 °C and used rapidly (within one week).

2.5. Recombinant cBid and Bcl-xL production

Recombinant human His₆-Bid was produced in *E.coli* strain BL21DE3* transformed with the expression plasmid pET23d-His₆-Bid, purified, and cleaved with caspase-8 as described by Kudla *et al* [47]. The protein was added with 15 % glycerol and stored at -80 °C in small aliquots.

Recombinant human His₆-Bcl-xL was produced in *E.coli* strain BL21DE3* transformed with the expression plasmid pET28a-His₆-Bcl-xL, as described by Yao *et al* [48]. The lysate contained folded His₆-Bcl-xL deprived of the 15C-terminal residues. The protein was added with 15 % glycerol and stored at -80 °C in small aliquots.

2.6. LUV preparation process and dextran release assay

3 mg of a phospholipid mixture mimicking mitochondrial lipid (46.5 % POPC, 28.5 % POPE, 9 % DOPS, 7 % Cardiolipin w/w/w/w) was dried for 3 h under argon flow [49]. The dry lipid film was re-hydrated in a LUV buffer (25 mM Na/Hepes pH 7.5, 200 mM NaCl) supplemented with 10 mM FITC-Dextran 10 kDa (Sigma). The mixture was sonicated in a water bath for 3 min and extruded through a 400 nm pore size Nucleopore Track-Etched membrane in a Liposofast extruder (Avestin). LUV were applied on a 10 mL Sephadex-G50 gravity flow column. 1 mL fractions were collected and the LUV containing fractions were identified by their cloudy appearance.

The Dextran release assay was based on a previously published

protocol [50]. A mixture containing 20 μL LUV and 8 μg anti-FITC antibody (ThermoFisher) was prepared. The assay was performed at 30 °C using 96-well plates. Resolubilized BaxWT or BaxP168A were passed through a detergent-removal spin column (Pierce) and added to liposomes. Technical datasheet indicates that these columns remove >95 % of most detergents, including Brij-58, that would decrease the Brij-58 concentration down to 0.0025 %. After the passage on the column, Bax concentration is $\sim 0.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ and 0.1 μg is added to 100 μL of liposomes suspension (Bax final concentration: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Therefore, the final concentration of Brij-58 in the assay is approximately 0.000125 %. Previous experiments have shown that, in the time-course of the experiment, 0.01 % Brij-58 did not permeabilize liposomes (same lipid composition) loaded with ANTS, a molecule much smaller than Dextran-FITC (see Fig. 6A in ref. [28]). FITC fluorescence was measured every 1 min during 60–90 min in a microplate fluorescence reader (Clariostar, BMG Labtech). The excitation and emission wavelengths were set at 495 nm and 521 nm, respectively. The 0 % of fluorescence decay was measured on the mixture of LUV and anti-FITC antibody alone, and the 100 % of decay was measured after adding 0.5 % CHAPS.

2.7. Flotation assay

LUV were prepared as above, without FITC-dextran. 30 % and 80 % (w/w) Histodenz (Sigma) stock solutions were prepared in LUV buffer. 100 μL of resolubilized BaxWT ($\sim 5 \mu\text{g}$) were mixed with 100 μL of LUV, completed to 1 mL with LUV buffer, and incubated for 1–2 h at 4 °C. 750 μL of the 80 % Histodenz solution were added and thoroughly mixed with 750 μL of the protein-LUV sample in Thinwall centrifuge tubes (Beckman 50.2ti rotor). 1.5 mL of the 30 % Histodenz solution was added as the intermediate layer, and 1.5 mL LUV buffer was added as the top layer. Tubes were centrifuged overnight at 107,000 $\times g$ at 4 °C in a 50.2ti swinging bucket rotor in a Beckman L-90 K ultracentrifuge. The gradients were fractionated in 500 μL aliquots, and precipitated by adding 0.3 M (final concentration) Trichloroacetic acid. After a 2-h incubation at 4 °C, samples were centrifuged (15 min, 20,000 $\times g$, 4 °C) and pellets were washed with 100 μL of cold acetone. After a centrifugation (15 min, 20,000 $\times g$, 4 °C) pellets were dried at room temperature, resolubilized in Laemmli buffer, and analyzed by Western blotting against Bax.

2.8. Circular dichroism (CD)

Samples for CD measurement were dialyzed against 40 mM Sodium Phosphate buffer (pH 7.2) in dialysis cassettes (Slide-A-Lyzer, ThermoFisher) to remove Cl^- ions. Far UV spectra (190–260 nm) were measured on a Jasco J-810 CD spectropolarimeter. The acquisition was carried out at 25 °C with a 1 mm optical path length cell under nitrogen atmosphere. The fractions obtained after the dialysis were diluted to 65–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 200 μL . 10 scans were collected from 260 to 190 nm at 0.5 nm intervals, then averaged and baseline-corrected by subtracting buffer spectra. They were analyzed at Dichroweb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>) using the CDSSTR algorithm [51] with the SP175 dataset as a reference [52].

2.9. Dynamic light scattering (DLS)

The DLS of eluted nanodisc-containing fractions from SEC was measured in a Wyatt Dynapro Nanostar, using the standard mode of acquisition, in Eppendorf UVettes. The time delay curves were examined and the boundaries were slightly adjusted if needed.

2.10. Mitochondria permeabilization

Mitochondria from the yeast wild-type strain W303–1B were isolated and Bax permeabilization assay were done as described previously [28]. Briefly, mitochondria were suspended at 1 mg/mL in 0.1 mL of

PMB buffer (10 mM K/Hepes pH 7.4, 250 mM sucrose, 80 mM KCl, 2 mM MgOAc, 1 mM KH_2PO_4 , 1 mM ATP, 0.08 mM ADP, 5 mM succinate). After Bax and adequate controls were added, samples were incubated for 1 h at 30 °C. Samples were then centrifuged (25,000 $\times g$, 10 min, 4 °C). The mitochondrial pellet was resuspended in 100 μL water and mitochondrial proteins were precipitated with 0.3 M Trichloroacetic acid (see flotation assay). The pellet was washed with acetone, dried and resolubilized in Laemmli buffer.

2.11. Immunoprecipitation and co-immunoprecipitation

For immunoprecipitation assays, 50 ng of Bax-containing nanodiscs were added with 1 μg of anti-Bax 2D2 or anti-Bax 6A7 mouse monoclonal antibodies (Santa-Cruz) and incubated overnight at 4 °C. 50 μL of a suspension of Protein G coupled to agarose beads (Sigma) previously equilibrated in Bax buffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0; 200 mM NaCl) were added and incubated for 3 h. Agarose beads were washed 4 times on IP columns (Sigma) with a washing buffer (25 mM Tris/HCl pH 7.4, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Nonidet P40, 10 % glycerol) and twice with the same buffer at a 0.1 \times dilution. Bound proteins were recovered by adding a small volume of Laemmli buffer without β -mercaptoethanol and a 15 min incubation at 65 °C.

For co-immunoprecipitation assays, 50 ng of Bax-containing nanodiscs were incubated with 100 ng of Bcl-xL for 1 h. 1 μg of mouse monoclonal anti-Bax antibody (2D2, Santa-Cruz) or rabbit monoclonal anti-Bcl-xL antibody (E18, Abcam) were added and incubated overnight at 4 °C. The remaining steps were as above.

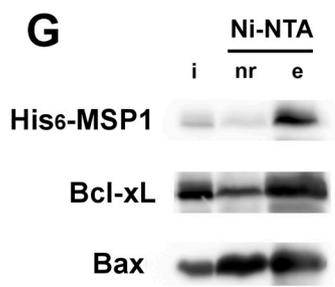
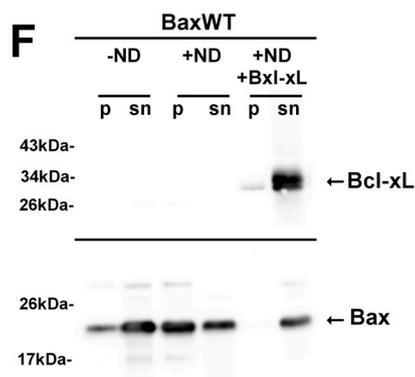
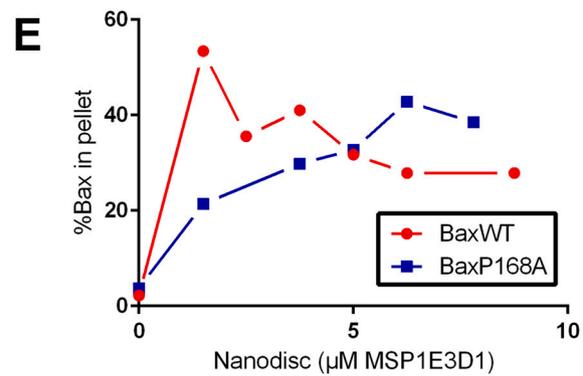
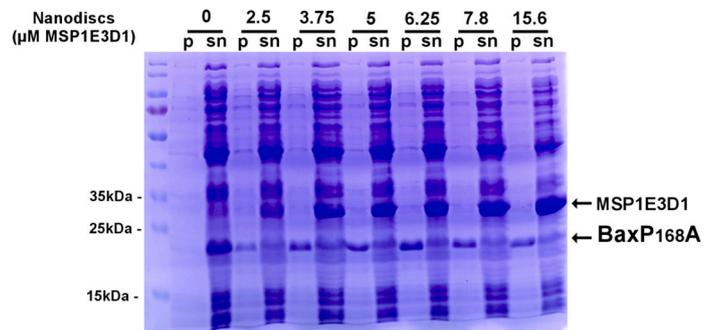
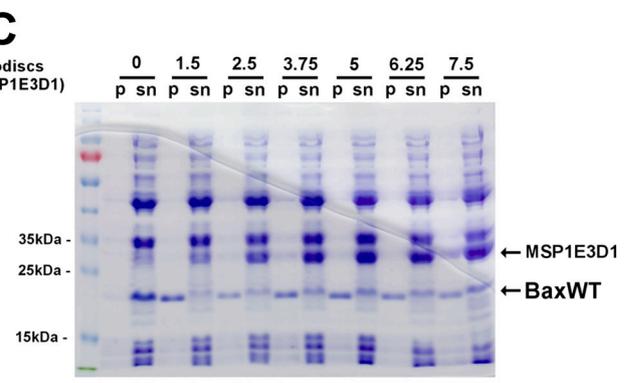
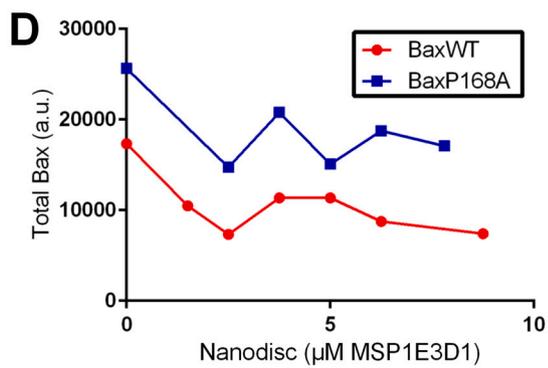
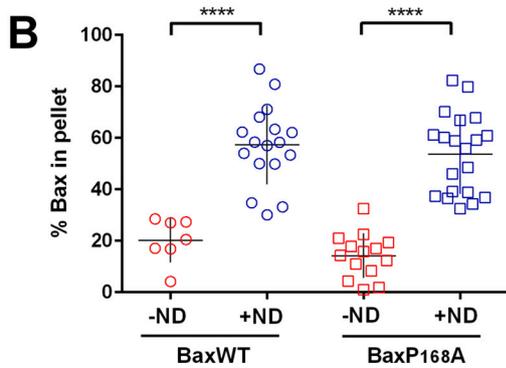
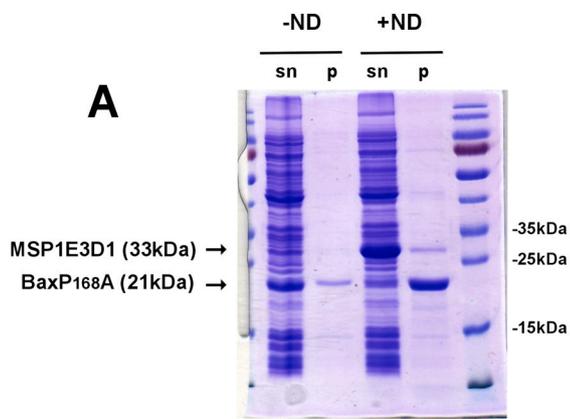
2.12. Transmission electron microscopy (TEM)

Nanodiscs were negatively stained according to Daury *et al* [53]. Briefly, sample was applied to a glow-discharged carbon-coated copper 300 mesh grids and stained with 2 % uranyl acetate (w/v) solution. Images were recorded under low-dose conditions on a Tecnai F20 FEG electron microscope (FEI, ThermoFisher Scientific) operated at 200 kV using an Eagle 4k_4k camera (ThermoFisher Scientific).

The area of nanodiscs was measured manually with Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>) and the dm3 reader plugin (https://imagej.nih.gov/ij/plugins/DM3_Reader.html). The average diameter was calculated by considering that they were perfect disks.

2.13. Protein dosage, SDS-PAGE and Western-Blots

Protein concentrations was determined by the bicinchonic acid (BCA)-assay (ThermoFisher). For SDS-PAGE and Western-Blots, protein samples were solubilized in Laemmli buffer (0.1 M Tris/HCl pH 8.0, 2 % SDS, 2 % β -mercaptoethanol, 10 % glycerol, 0.004 % Bromophenol Blue) and heated at 65 °C for 15 min. Samples were run on Tris/glycine 12.5 % SDS PAGE and transferred onto 0.2 μm PVDF membranes (Hybond, Amersham). Membranes were saturated with 5 % milk in PBS-Tween 20 (or TBS-Tween 20 for the anti-Bcl-xL antibody). Primary antibodies were added overnight at 4 °C, and secondary antibodies were added for 45 min at room temperature. Antibodies were as follows: rabbit polyclonal anti-human Bax N20 (Santa-Cruz) 1/5000 dilution, mouse monoclonal anti-human Bax 2D2 (Santa-Cruz) 1/5000 dilution, rabbit monoclonal anti-Bcl-xL antibody (E18, Abcam) 1/10,000 dilution, mouse monoclonal anti-his₆ tag (clone 4E3D10H2/E3, ThermoFisher) 1/10,000 dilution, mouse monoclonal anti-yeast porin (ThermoFisher) 1/50,000 dilution, rabbit polyclonal anti-yeast cytochrome c (custom antibody, Millegen) 1/5000 dilution, peroxidase-coupled goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch) 1/10,000 dilution, peroxidase coupled goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) 1/10,000 dilution. Peroxidase activity was revealed by Enhanced Chemiluminescence (Luminata Forte, Millipore), recorded with a digital camera (G-Box, Syngene) and analyzed with Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Coomassie Blue staining was done by



(caption on next page)

Fig. 1. The presence of nanodiscs induces the precipitation of Bax during cell-free protein synthesis.

(A) BaxP168A was synthesized in the absence (-ND) or in the presence (+ND) of nanodiscs. The reaction mix was centrifuged (20,000 xg; 10 min) and the supernatant (sn) and pellet (p) were solubilized in Laemmli buffer, ran on SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue.

(B) BaxWT and BaxP168A were synthesized in the absence (-ND) or in the presence (+ND) of nanodiscs. The reaction mixes were centrifuged (20,000 xg; 10 min) and identical proportions of the supernatants and pellets were solubilized in Laemmli buffer, ran on SDS-PAGE and analyzed by Western-Blots. The proportion of Bax in the pellet was calculated from non-saturated images. Each point represent independent experiments. Unpaired *t*-test was used for the statistical analysis.

(C) Cell-free synthesis of BaxWT (top) or BaxP168A (bottom) was done in the presence of a range of nanodisc concentrations (expressed as μM MSP1E3D1). After the synthesis, reaction mixes were separated as above and stained with Coomassie Blue. The same proportions of resuspended pellets and supernatants were loaded.

(D,E) The amounts of Bax in the pellets and supernatants were measured by the densitometry of Coomassie Blue-stained gels, and plotted v/s the concentration of nanodiscs. (D) Total Bax = Bax in pellet+Bax in supernatant. (E) Bax in pellet/Total Bax.

(F,G) BaxWT and Bcl-xL were co-synthesized in a cell-free assay. (F) Pellets and supernatants were analyzed by Western-Blots. (G) The supernatants containing nanodiscs (i) were pulled-down with Ni-NTA-sepharose and the presence of His₆-MSP1E3D1, Bcl-xL and BaxWT was analyzed in the non-retained fraction (nr) and the eluate (e). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

soaking the gels in ethanol/water/acetic acid 5/5/1 (v/v/v) for 10 min, staining with 0.25 % Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma) in the same mixture for 10 min, and destaining in the same mixture until the signal to background ratio is satisfactory. Plots were done with Graphpad Prism 6.05 software with the integrated statistical analysis tools. Except indicated otherwise, chemical products were from Sigma or Clinisciences.

3. Results

3.1. Effect of the presence of pre-formed nanodiscs on Bax cell-free synthesis

Our initial goal was to produce untagged full-length Bax in a cell-free protein synthesis system, in the presence of pre-formed nanodiscs, in order to get Bax as a nanodisc-inserted fraction. The rationale was that the neosynthesized peptide chain would be simultaneously integrated in the lipid bilayer of nanodiscs, so that hydrophobic domains were not exposed to the aqueous environment, thus preventing mis-folding and aggregation. We used a Bax mutant, carrying a single substitution P168A, that was previously shown to be spontaneously inserted in the

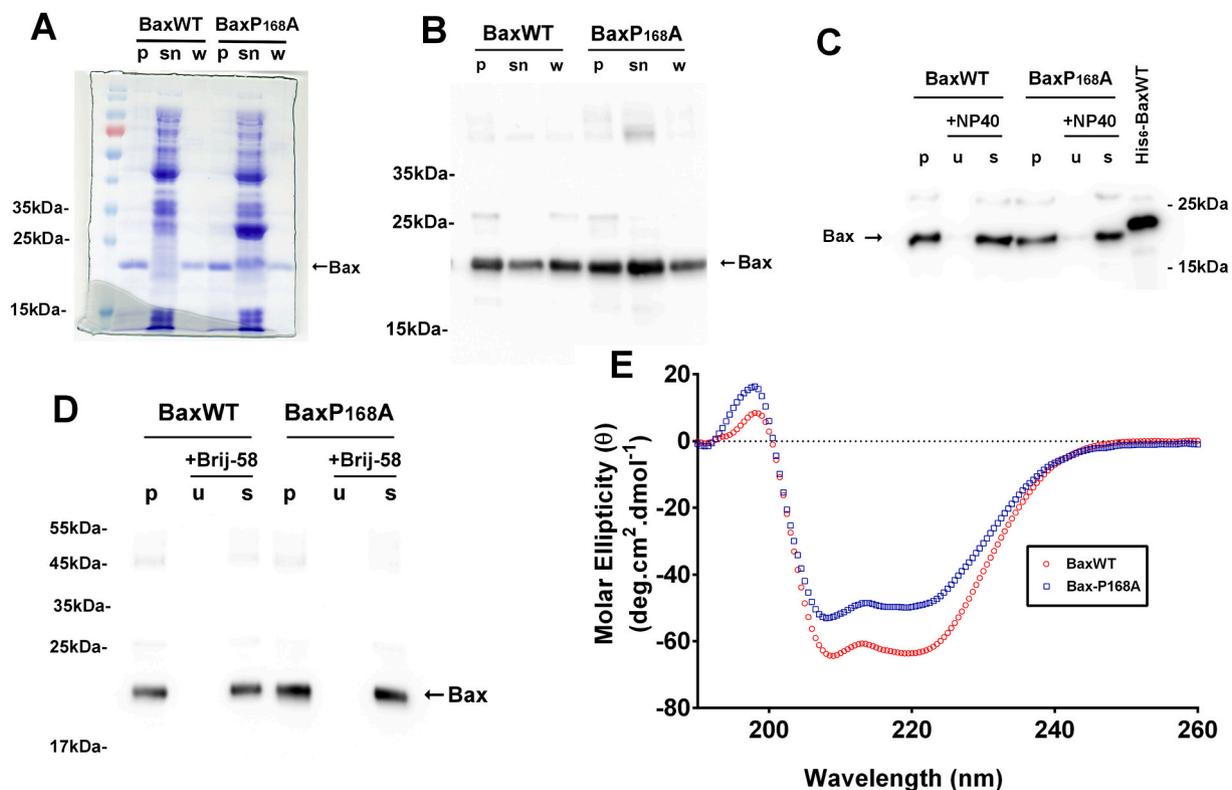


Fig. 2. Resolubilization of precipitated Bax.

(A,B) After the cell-free synthesis, the pellet (p) and supernatant (sn) were separated as in Fig. 1. The pellet was quickly washed with 500 mM NaCl and re-centrifuged (w). After separation on SDS-PAGE, proteins were revealed with Coomassie Blue staining (A) or Western-Blotting against Bax (B).

(C,D) Washed pellets (p) were added with a 10 mM Na/Hepes buffer (pH 7.6) containing 250 mM NaCl, 1 mM EDTA and 0.05 % Nonidet-P40 (C) or 0.05 % Brij-58 (D). The solubilization was done overnight at 4 °C under gentle agitation. After a 20,000 xg, 10 min centrifugation, the pellet of unsolubilized material (u) and solubilized proteins (s) were separated on SDS-PAGE and revealed by a Western-Blot against Bax. The lane labeled "His₆-BaxWT" contained a known amount of the His₆-tagged protein produced in the presence of F8-TAC and purified on His-Trap, and served as a quantification standard.

(E) Resolubilized proteins were dialyzed twice against a 40 mM Sodium Phosphate buffer (pH 7.2). The protein concentration were 84 and 67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for BaxWT and BaxP168A, respectively. Spectra were acquired between 260 and 190 nm at room temperature (20 °C) and corrected with the baseline. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1

Structure prediction calculated from CD spectra.

%	α -helices	β -structures	Random Coil
BaxWT (NRMSD = 0.002)	72 [67–84]	14 [5–23]	12 [1–23]
BaxP168A (NRMSD = 0.003)	71 [65–80]	16 [3–32]	13 [4–27]

Values were calculated with the CDSSTR algorithm at Dichroweb. The quality of the prediction is considered good when the NRMSD (Normalized Root Mean Square Displacement) is below 0.03. Values with the lower (optimal) NRMSD are indicated. Values between brackets indicate the range of other possibly good solutions.

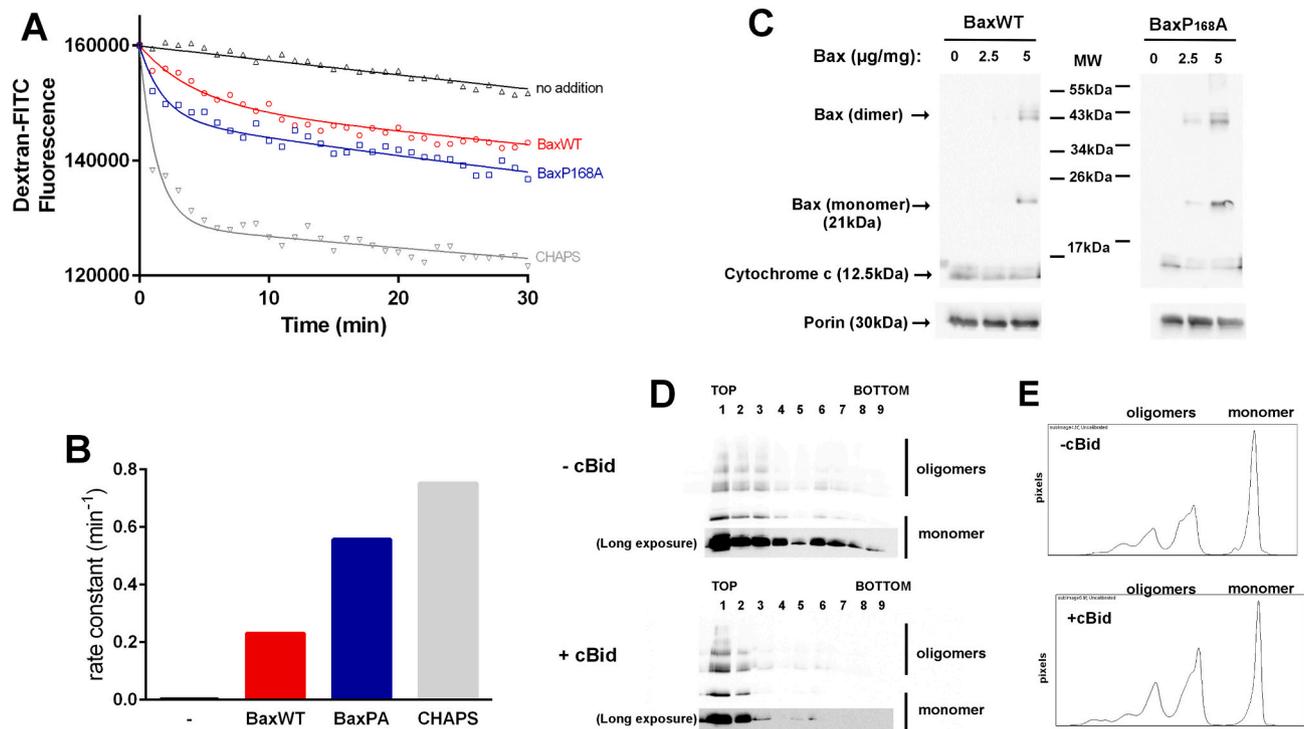
mitochondrial outer membrane when expressed in mammalian cells [26] and yeast cells [27]. A His₆-tagged version of this mutant, produced in a cell-free system in the presence of a small amount of the detergent Brij-58 or the polyfluorinated surfactant F8-TAC, was shown to permeabilize liposomes and isolated mammalian and yeast mitochondria [28].

After a 20 h production, the reaction mix was centrifuged, and the pellet and supernatant were analyzed by Coomassie Blue staining (Fig. 1A). Unexpectedly, we observed that the presence of nanodiscs led to an increased proportion of BaxP168A in the pellet.

We next tested if this behavior was due to the peculiar property of BaxP168A, that is spontaneously more membrane-associated than wild-

type Bax. A large series of assays show that this behavior was also observed for BaxWT (Fig. 1B). We next tested whether this precipitation was dependent on nanodiscs amount. A range of nanodisc concentrations was added to test their ability to induce the precipitation of both BaxWT and BaxP168A (Fig. 1C-E). We first observed that, in the presence of nanodiscs, the total amount of synthesized BaxP168A (supernatant+pellet) tended to decrease (Fig. 1C,D). However, the behavior of BaxWT was slightly different. Indeed, while the proportion of precipitated BaxP168A increased with the concentration of nanodiscs, the precipitation of BaxWT was maximal at a low nanodiscs concentration (1.5 μ M MSP1E3D1) and then decreased (Fig. 1E). Note that the range of nanodisc concentrations inducing these effects may slightly vary between experiments. This was likely due to the “quality” of nanodiscs preparations. However, the general behavior and the difference between BaxWT and BaxP168A was highly reproducible.

We hypothesized that, in the presence of the lipid bilayer provided by a small amount of nanodiscs, BaxWT acquired a conformation that limited its solubility, but remained poorly able to be inserted into nanodiscs, thus promoting its precipitation. The effect was less dramatic with BaxP168A, which can be, at least partly, inserted into nanodiscs. To support this hypothesis, we did co-synthesis experiments with BaxWT and Bcl-xL. Indeed, we have previously shown that Bcl-xL stimulated the localization of BaxWT in the outer mitochondrial membrane of non-apoptotic mammalian cells and of yeast cells [54]. When both proteins were synthesized together in the presence of nanodiscs, BaxWT was not

**Fig. 3.** Properties of resolubilized BaxWT and BaxP168A.

(A,B) Liposomes loaded with 10 kDa Dextran-FITC were prepared as indicated in the Methods section. A mixture containing loaded LUV and an anti-FITC antibody was prepared and displayed in a 96-well black microplate. LUV buffer was added to adjust the final volume at 100 μ L. At time 0, 100 ng BaxWT or BaxP168A or 0.05 % CHAPS were added and the fluorescence was measured in a fluorescence plate reader (ex: 495 nm; em: 521 nm) over time. Curves were fitted with Grafpad software and the initial rates were calculated (B), assuming a one-phase (no addition) or a two-phases decay.

(C) The permeabilization of yeast mitochondria was done as described in the Methods section. Mitochondria were incubated in the presence of the indicated amount of Bax (μ g Bax per mg of mitochondrial proteins). The pellets were run on SDS-PAGE and Bax, cytochrome *c* and Porin (as a control) were revealed by Western-Blots. The release of cytochrome *c* was estimated from the decrease of the protein in the mitochondrial pellet.

(D) BaxWT incubated in the presence of LUV, in the absence (-cBid) or in the presence (+cBid) of caspase-3-cleaved Bid (molar ratio Bax/cBid = 5). After the incubation, LUV were mixed with 80 % Histodenz in LUV buffer and layered at the bottom of ultracentrifuge tubes. The mix was overlaid with 30 % Histodenz in LUV buffer and with LUV buffer alone. After the ultracentrifugation, the gradients were recovered as 9 fractions, proteins were precipitated, separated on SDS-PAGE and Bax was revealed by Western Blot. Where indicated, the blotting membranes were overexposed to highlight the presence of Bax in more dense fractions.

(E) Normally exposed lanes 1 of each membrane in (D) were analyzed by densitometry. The presence of cBid increased the proportion of oligomers by 20–30 %.

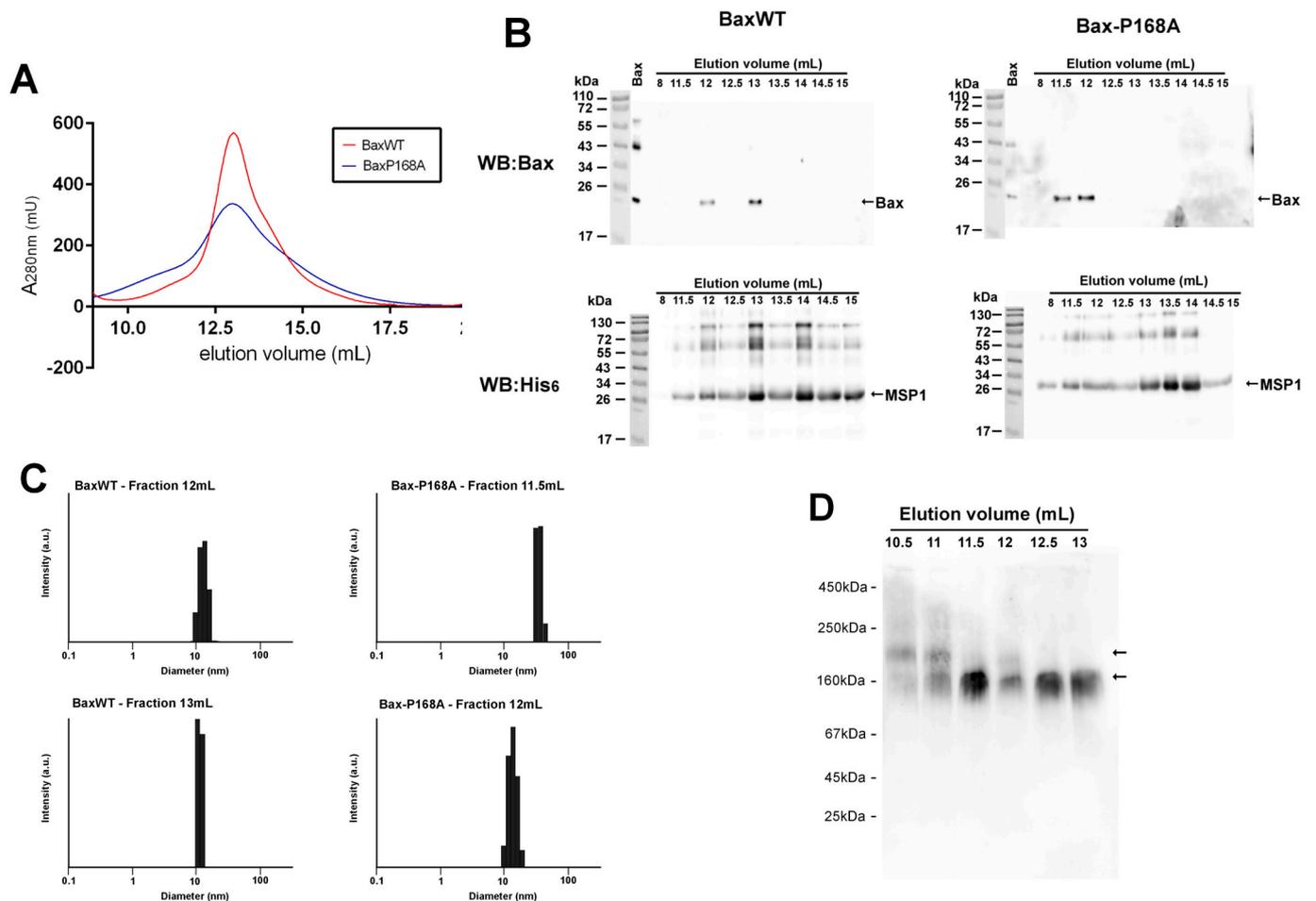


Fig. 4. Co-formation of Bax-containing nanodiscs.

(A) Bax and nanodiscs were co-formed as described in the method section. Nanodiscs were then loaded on a SEC column (Superdex 200 10/300GL, GE Healthcare) connected to an Äkta purifier. Fractions were eluted with a 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 buffer containing 100 mM NaCl, at a constant rate of 0.5 mL per minute. Selected fractions were analyzed by Western Blot against Bax and His₆-MSP1E3D1 (B) and by DLS (C). In (B), the lane labeled “Bax” contains the resolubilized protein not reconstituted in nanodiscs.

(D) CN-PAGE of SEC fractions of empty nanodiscs were blotted and revealed with anti-His₆ antibody, showing 2 populations.

precipitated and both proteins were found in the supernatant (Fig. 1F). Furthermore, pull-down against His₆-MSP1E3D1 showed that the vast majority of Bcl-xL and a large proportion of BaxWT were indeed associated with nanodiscs (Fig. 1G).

3.2. Resolubilisation of precipitated Bax by detergents

When synthesized in the presence of nanodiscs, pelleted Bax was largely devoid of contaminants from the bacterial lysate (Fig. 1A). This purity could be further improved by quickly washing the pellet in the presence of 500 mM NaCl (Fig. 2A,B). The high degree of purity opened an opportunity to recover purified full-length Bax without any additional residue. We thus attempted to resolubilize it to test if the protein could be used for further biochemical studies. Both 0.1 % Nonidet P40 (NP-40) (Fig. 2C) and 0.05 % Brij-58 (Fig. 2D) efficiently resolubilized both BaxWT and BaxP168A. Since we have previously shown that Brij-58 adequately maintained the properties of His₆-tagged Bax, and namely the distinct properties of BaxWT and BaxP168A [28], we selected this detergent for further studies on resolubilized untagged Bax.

The conformation of resolubilized Bax was assessed by CD spectroscopy (Fig. 2E). Resolubilized Bax was dialyzed against 40 mM sodium phosphate (pH 7.2), to eliminate Cl⁻ ions. Both solubilized proteins generated CD spectra that were compatible with a large proportion of α -helices (~70 %) (Table 1). These values were similar to

those previously acquired with His₆-Bax produced in cell-free synthesis in the presence of 0.01 % Brij-58 or 0.05 % F8-TAC [28] and are consistent with the known Bax structures [9,34]. From these results, Bax precipitated and resolubilized did not significantly differ, in terms of CD spectra, from His₆-Bax that has been maintained in solution along the purification process.

The next step was to test if resolubilized Bax kept its functional properties. Bax activity was assayed as its capacity to permeabilize liposomes loaded with FITC-Dextran 10 kDa, which size is close to that of cytochrome *c* (12.5 kDa). Both BaxWT and BaxP168A induced a permeabilization of liposomes, with a slightly greater effect of the mutant (Fig. 3AB). This modest difference between BaxWT and BaxP168A had already been observed for His₆-tagged proteins synthesized in the presence of Brij-58 (or F8-TAC) and tested on liposomes loaded with small molecules ANTS/DPX (<1 kDa) [28].

The capacity of resolubilized Bax to bind and permeabilize isolated mitochondria was next tested. For practical reasons, we used isolated yeast mitochondria, that behave like mammalian mitochondria in *in vitro* assays [28]. Both BaxWT and BaxP168A bound to mitochondria and induced the release of cytochrome *c* (Fig. 3C). However, the difference in the efficiencies of BaxP168A and BaxWT was marginal.

Flotation assays were done to further analyze the capacity of resolubilized Bax to associate with liposomes. A mixture of liposomes and Bax was layered at the bottom of a Histodenz gradient. After

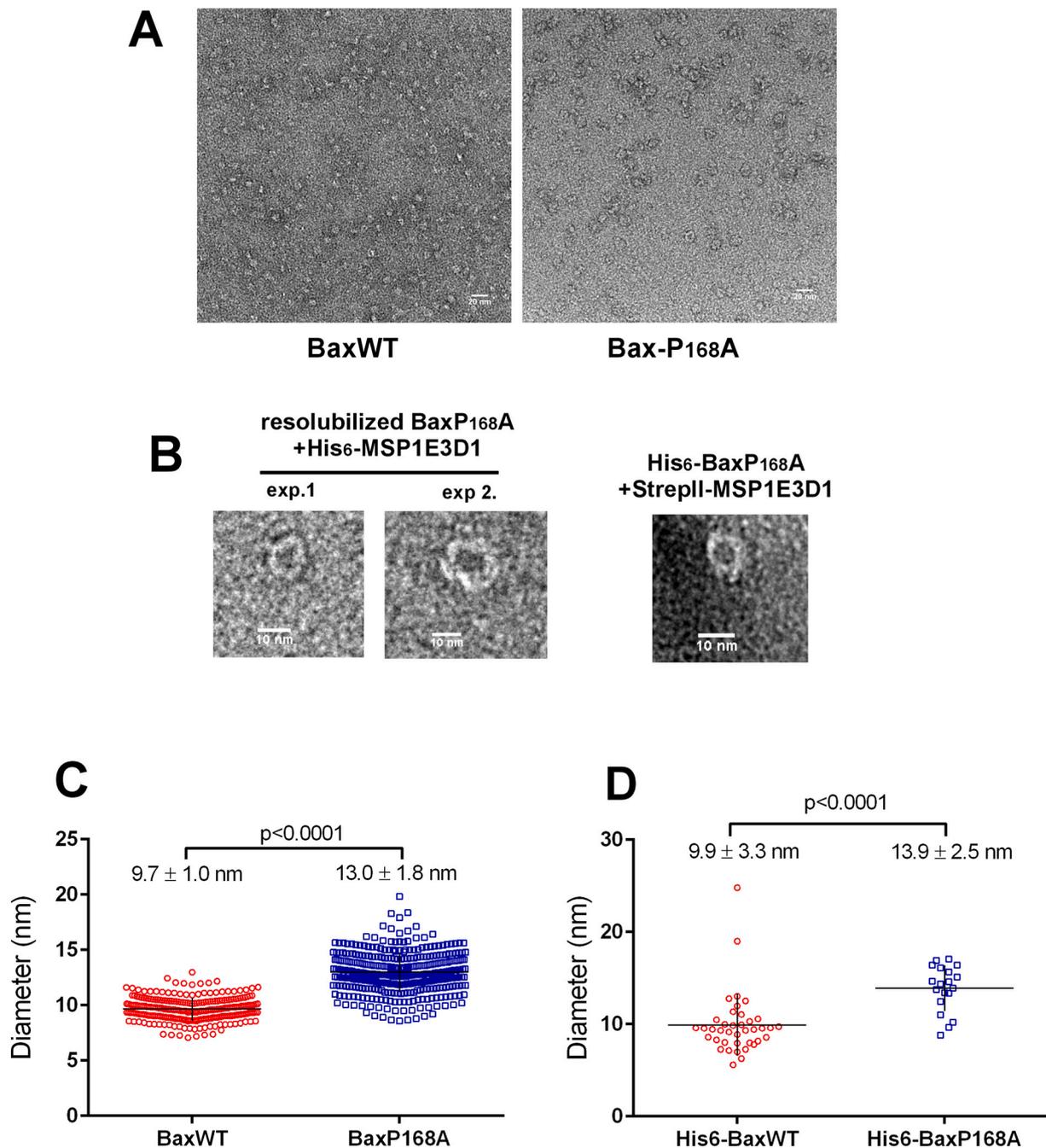


Fig. 5. TEM of Bax-containing nanodiscs

(A) TEM images of fractions 12 mL (see Fig. 4) of BaxWT and BaxP168A.

(B) Magnification of individual BaxP168A-containing nanodiscs obtained with precipitated and resolubilized untagged BaxP168A in His₆-MSPE3D1 nanodiscs purified by SEC in two independent experiments, or with His₆-BaxP168A in StrepII-MSP1E3D1 nanodiscs doubly purified by Strep-Tactin and Ni-NTA affinity chromatographies (see methods).

(C) Size quantification of nanodiscs co-formed with precipitated/resolubilized BaxWT and BaxP168A was done manually on dm3 TEM images. The perimeter of nanodiscs was drawn and the measured surface was converted to diameters by assuming that they were perfect discs. Both distributions passed the D'Agostino's K-squared normality test, so that an impaired *t*-test could be done ($n = 266$ and 386 for BaxWT and BaxP168A, respectively).

(D) Size quantification of BaxWT or BaxP168A-containing nanodiscs purified by a double affinity chromatography (using StrepII-MSP1E3D1 and His₆-Bax tagged proteins) was done manually on dm3 TEM images. The perimeter of nanodiscs was drawn and the measured surface was converted to diameters by assuming that they were perfect discs. The distribution of BaxP168A nanodiscs passed the D'Agostino's K-squared normality test, so that an impaired *t*-test could be done ($n = 39$ and 19 for BaxWT and BaxP168A, respectively).

centrifugation, Bax was mostly found in the top fractions (Fig. 3D), showing that it was associated with liposomes. As expected, the association was significantly stimulated by the presence of cBid. Also, cBid slightly increased the proportion of dimeric and oligomeric forms of Bax (Fig. 3E).

From these data, resolubilized BaxWT and BaxP168A both retained similar biochemical properties as His₆-tagged proteins that were previously produced in cell-free protein synthesis in the absence of precipitation [28], suggesting that the precipitation/resolubilization cycle did not significantly alter BaxWT and BaxP168A properties, and that these

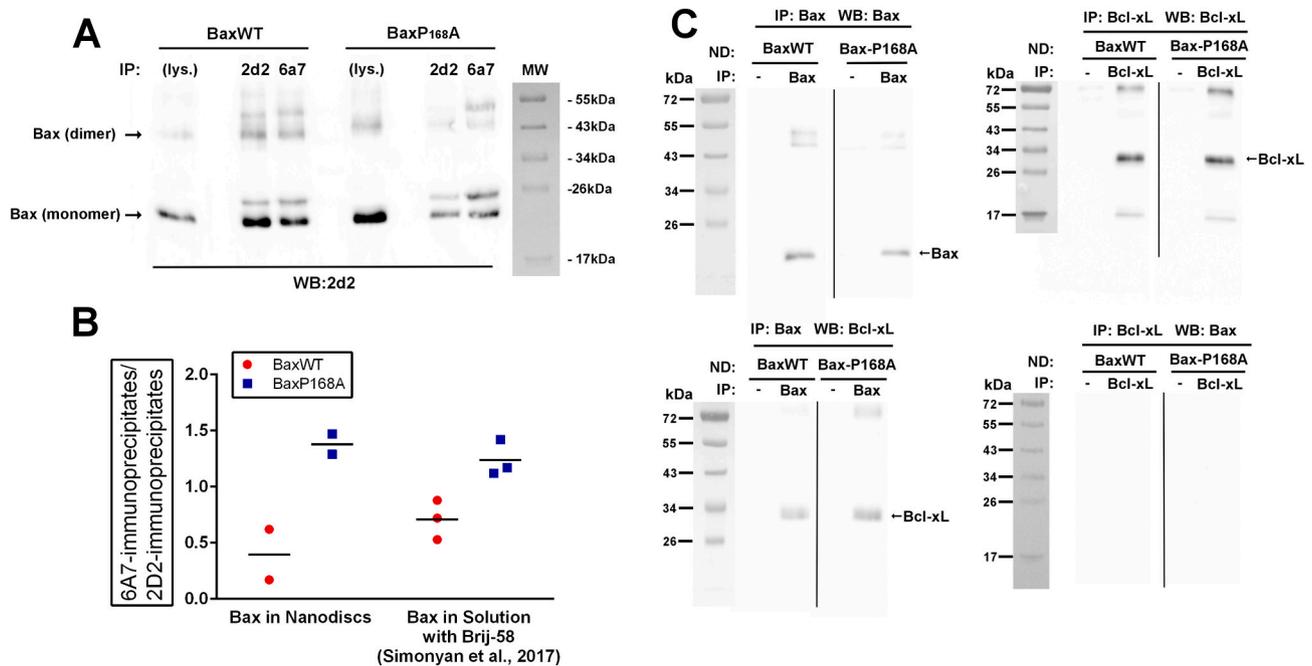


Fig. 6. Functional properties of Bax in nanodiscs

(A,B) BaxWT or BaxP168A-containing nanodiscs were incubated overnight with mouse monoclonal anti-Bax antibodies 6A7 or 2D2, that recognize active Bax or total Bax, respectively [64]. Immunoprecipitates were loaded on SDS-PAGE and revealed by Western-Blot with the 2D2 antibody. (B) The ratio 6A7/2D2 was measured for both BaxWT and BaxP168A, and was compared with previous experiments done with His₆-tagged proteins produced in the presence of Brij-58 [28]. (C) BaxWT or BaxP168A-containing nanodiscs were incubated overnight in the absence or in the presence of anti-Bax (2D2) or anti-Bcl-xL (E18) antibodies. The immunoprecipitates were loaded on SDS-PAGE and revealed by Western-Blots against Bax or Bcl-xL.

proteins could be used in reconstitution assays.

3.3. Co-formation of Bax-containing nanodiscs

The excess of Brij-58 was first eliminated by a single passage on detergent removal columns. 50 to 60 % of the proteins were recovered after this step, after which the proteins were used immediately, to avoid further precipitation. Nanodiscs of POPC/POPG 3:1 (w/w) and MSP1E3D1 were then co-formed in the presence of BaxWT or BaxP168A by removing cholate with Bio-Beads. Assays have also been done to remove detergents by overnight dialysis, and gave essentially similar results in the following experiments. After centrifugation (20,000 xg, 15 min) and filtration (0.2 μm), the mixture was loaded on a Sephadex G200 10/300GL column. Typical SEC profiles are shown in Fig. 4A.

A first peak around 6-8 mL contained objects with a size well above 100 nm (measured by DLS, not shown) and likely corresponded to MLV that do not contain any detectable amount of Bax (Fraction 8 mL in Fig. 4B). Main fractions were eluted between 10 mL and 14 mL with a shoulder between 10 mL and 12 mL that was higher for BaxP168A, compared to BaxWT.

Fractions from BaxWT reconstitution eluted between 11 mL and 14 mL contained objects having an apparent size close to the expected size of nanodiscs, with an apparent diameter close to 12.5 nm (Fig. 4C). Western-blot analysis of these fractions showed that the earlier fractions of the peak (12 mL and 13 mL) contained both Bax and MSP1E3D1 while later fraction (13.5 mL to 15 mL) contained only MSP1E3D1. This suggested that a separation occurred between slightly larger nanodiscs containing Bax and smaller empty nanodiscs. The presence of two distinct populations of BaxWT-containing nanodiscs (fractions 12 mL and 13 mL) was not related to the presence of Bax: indeed, two distinct populations of empty nanodiscs (without Bax) were also observed by CN-PAGE (Fig. 4D).

For BaxP168A, an additional early fraction appeared (Fraction 11.5 mL) that contained larger objects with an apparent average diameter

above 20 nm (Fig. 4C). Fraction 12 mL contained objects having the same size as fraction 12 mL of BaxWT, around 12.5 nm. Both fractions 11.5 mL and 12 mL contained Bax and MSP1E3D1 (Fig. 4B) while later fractions, like for BaxWT, contained only MSP1E3D1.

Fractions containing both Bax and MSP1E3D1 were then observed by TEM after negative staining. Both fractions from BaxWT and BaxP168A contained objects having the appearance and expected size of nanodiscs (Fig. 5A,B). The area of objects was measured and their average diameter was calculated (considering them as discs) (Fig. 5C). As expected from the Western-Blots of SEC fractions, the size of BaxP168A nanodiscs was larger than the size of BaxWT nanodiscs. This is consistent with the hypothesis that BaxP168A tends to form stable oligomers that might generate physical constraints leading to significantly larger nanodiscs. This is in accordance with the biochemical properties of BaxP168A, that is spontaneously more active than BaxWT, as reported above (Fig. 3) and in previous studies [28]. Furthermore, a set of co-formation experiments has been done with His₆-tagged Bax produced in the presence of StrepII-tagged MSP1E3D1 (see material and methods). Although most of Bax was precipitated (like in the experiments with untagged Bax and His₆-MSP1E3D1), the small amount of Bax-containing nanodiscs present in the supernatant was next purified by two successive affinity chromatographies on Strep-Tactin and Ni-NTA, and observed by TEM. The very low yield of these experiments only permitted a limited number of observations. Nevertheless, the same difference of size was observed between nanodiscs containing BaxWT and BaxP168A (Fig. 5C v/s Fig. 5D).

3.4. Functional Bax properties in nanodiscs

The BaxP168A mutant was first characterized by its higher spontaneous mitochondrial localization and its greater capacity to permeabilize the outer mitochondrial membrane when expressed in yeast [27] or mammalian cells [26]. In a previous study, we observed that the His₆-tagged version of BaxP168A produced in cell free exhibited an increased recognition by the 6A7 monoclonal antibody [28], that has a

greater affinity for active Bax [55]. We then tested if the same property was observed when the protein was reconstituted in nanodiscs (Fig. 6A). The ratio of Bax immunoprecipitated by the 6A7 antibody over the ratio of Bax immunoprecipitated by the 2D2 antibody was higher for BaxP168A than for BaxWT (Fig. 6B). Of note, the difference between the two proteins was very similar to that previously observed for the His₆-tagged proteins in solution in the presence of Brij-58 [28] (Fig. 6B).

The anti-apoptotic protein Bcl-xL is one of the main partners of Bax, that prevents the formation of the large-size pore initiating the release of apoptogenic factors. The mechanism of action of Bcl-xL on Bax is still discussed: the proteins are able to interact in solution (e.g. [56]), Bcl-xL stimulates the retrotranslocation of Bax from the OMM to the cytosol [57], but it has also been shown that Bcl-xL could stimulate the mitochondrial translocation of Bax in non-apoptotic cells [54], thus promoting the engagement of Bax in an inactive membrane-associated heterodimer, from which active Bax can be further released by a BH3 peptide or a BH3-mimetic [58].

BaxWT and BaxP168A nanodiscs were incubated in the presence of recombinant Bcl-xL, and the co-immunoprecipitation of the two proteins was measured (Fig. 6C). Antibodies directed against Bax allowed the co-immunoprecipitation of Bcl-xL, suggesting that Bcl-xL was able to interact with Bax reconstituted in nanodiscs. There was no obvious difference between BaxWT and BaxP168A. Conversely, we could not depict Bax in Bcl-xL-immunoprecipitates, even after an extended exposure. These results suggested that the two proteins were still able to interact but that the conformation of Bax in the nanodisc bilayer may somehow decrease the affinity between Bax and Bcl-xL, and jeopardize the co-immunoprecipitation of Bax by the Bcl-xL antibody.

4. Discussion

In a previous study, we showed that Bax could be produced in a cell-free protein synthesis system as a soluble protein, in the presence of a small amount of the detergent Brij-58 or the fluorinated surfactant F8-TAC [28]. The protein was produced as a His₆-tagged protein to facilitate further purification from the bacterial lysate. The comparison between the BaxWT protein and the constitutively more active mutant BaxP168A showed that the native properties of the protein were conserved. The initial goal of the present study was to associate the cell-free protein synthesis system and the presence of nanodiscs to reconstitute the protein at the same time as it was translated, as it has been done for other membrane proteins [42–44]. Rather unexpectedly, we observed that the presence of nanodiscs during the synthesis induced the precipitation of Bax. By modulating the concentration of nanodiscs, we observed that the “optimal” concentration (i.e. inducing the maximal precipitation) was different for BaxWT and BaxP168A (Fig. 1E): it was about 1.5 μM (measured as MSP1E3D1 concentration) for BaxWT, while a plateau above 8 μM was observed for BaxP168A (higher concentrations of nanodiscs could not be easily tested, because the cell free assay only permitted a small volume of “custom” additions). The nanodisc concentration giving the maximal precipitation ratio could vary, depending on nanodiscs preparations, but the general shape of the curves were conserved for both BaxWT and BaxP168A. The fact that a small addition of nanodiscs is sufficient to initiate a high precipitation of BaxWT might be related to the presence of the lipid bilayer, that may initiate a partial conformational change of Bax, as it has been shown when Bax was added to liposomes [59]. However this conformational change might not go all the way until the fully inserted protein, because of the absence of contributing factors, such as the mitochondrial receptor Tom22 [60–62]. In accordance to this hypothesis, the precipitation occurs at higher nanodiscs concentrations for BaxP168A that is able to insert spontaneously in lipid bilayers. The precipitation of BaxP168A may thus occur only when nanodiscs are saturated, that would explain the different shapes of the curves for the two Bax variants. Interestingly, it has been previously shown on isolated mitochondria, that once a fraction of Bax is membrane-inserted, it can serve as a receptor for

soluble Bax [63]. This might explain why, after a peak at low MSP1E3D1 concentrations, BaxWT precipitation decreased at higher concentration and then stabilized at a level close to that of BaxP168A: this might correspond to the insertion of enough Bax molecules, serving as receptors to the next neosynthesized ones. In the case of P168A, that has spontaneously the adequate conformation for its insertion, the precipitation curve increased continuously. This hypothesis was supported by the fact that the co-synthesis of BaxWT with Bcl-xL in the presence of nanodiscs prevented the precipitation of BaxWT. We have reported previously that, both in non-apoptotic mammalian cells and in yeast cells, the co-expression of Bcl-xL increased the localization of BaxWT in the outer mitochondrial membrane [54]. The fact that this effect occurred in yeast cells, that do not express any Bcl-2 family member, suggested that it only depended on the two proteins. This is confirmed by these cell-free synthesis assays, performed in the presence of nanodiscs, where no additional partner of BaxWT and Bcl-xL are present.

The pellet was contaminated by several bacterial proteins from the lysate, that could be eliminated by a simple wash of the pellet with NaCl (Fig. 2A). This offered the opportunity to obtain untagged Bax with a degree of purity high enough to be used in biochemistry experiments. As described previously [28], Bax can be produced in cell-free synthesis as a N-terminal His₆-tagged protein with a high yield and a high degree of purity. His₆-tagged Bax keeps its functional properties (permeabilization of liposomes and mitochondria, interaction with Bcl-xL) and the expected differences between His₆-BaxWT and His₆-BaxP168A were observed, although somewhat attenuated as compared to the proteins expressed in yeast or human cells. An important regulation of Bax activation is linked to the movement of the unstructured N-terminal part. Indeed, it has been shown that the deletion of the 20 N-terminal residues of Bax generated a protein having a much greater capacity to bind to mitochondria and to permeabilize the OMM in both yeast and human cells [33,64] and to induce apoptosis in human cells [33,65]. This domain has been named ART (Apoptotic Regulation of Targeting) [64]. Interestingly, a similar splicing variant (called Bax^Ψ) was found in low-grade glioblastomas showing a greater rate of apoptosis [66]. This higher activity of N-truncated Bax might be related to the observation that the R9 residue, located in the ART, might interact with the D154 residue located in the loop between helices α7 and α8: indeed, the inversion of one of these charges (E9 or K154) induced the activation of Bax, while a double inversion (E9/K154) had the same activity as the wild-type protein (R9/D154) [19]. This suggests that the presence of a positively charged His₆-tag at the N-terminus might potentially interfere with Bax activation. It is thus desirable to produce the untagged protein. The introduction of a cleavable tag (with a Factor X-recognition sequence) has been done, but the low efficacy of the cleavage led to a 50 % decrease of the yield of the protein (Simonyan and Manon, unpublished data) and two additional residues remain after the cleavage. The method of choice to produce untagged Bax has been the fusion with intein, allowing the purification on chitin-sepharose beads and the autocleavage of the tag in the presence of reducers β-mercaptoethanol or DTT [9]. However, the method is not without inconvenients: the production yield is low, the efficacy of cleavage is lower than 50 % and, due to the low yield, additional purification steps are required to eliminate several bacterial proteins that further decreased the yield.

Because we had previously shown that Brij-58 preserved Bax functions [28], this detergent was used to resolubilize BaxWT and BaxP168A. The properties of the resolubilized proteins were not significantly different from the properties of His₆-Bax directly synthesized in the presence of Brij-58 or F8-TAC. CD spectra showed that both proteins were organized as α-helices (~70 %), corresponding to the measurements on His₆-tagged proteins [28] and to the proportion that can be deduced from the structure (66 %) [9]. Both proteins were able to bind to liposomes in a flotation assay, and to form pores, with a size large enough to permeabilize the membranes to 10 kDa-dextran, which is close in size to cytochrome c (12.5 kDa). Both proteins were also able to permeabilize yeast mitochondria to cytochrome c. Interestingly, in all

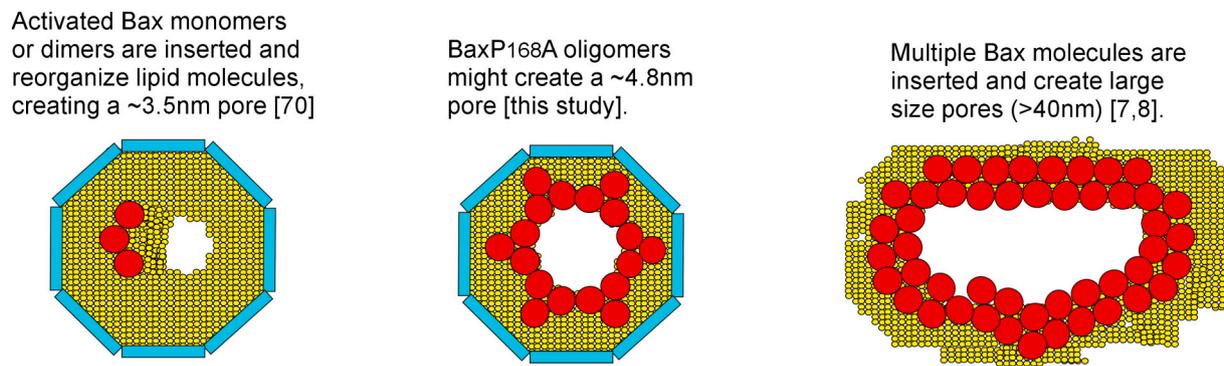


Fig. 7. Schematic representation of different Bax pores

Left: Recombinant wild-type His6-Bax activated by the Bid-BH3 peptide forms ~ 3.5 nm pores when co-formed in nanodiscs [70]. The reorganization of lipid molecules in close proximity to Bax in a constrained space is sufficient to generate the pore in a more distant domain of the bilayer [71].

Right: Endogenous Bax in actinomycin D-treated U2OS cells [7], or GFP-Bax expressed in HeLa cells [8] form large ring structures (40 to 100 nm in diameter) in the OMM. Heat-activated recombinant Bax form similar large ring structures observed by AFM [8].

Center: Recombinant BaxP168A oligomers generate nanodiscs having a size compatible with the existence of a ~ 4.8 nm pore, consistent with electrophysiology experiments [6,35].

these experiments, BaxP168A was, as expected, slightly more active than BaxWT, a property that has been previously observed for the His₆-tagged proteins synthesized and maintained in solution in the presence of F8-TAC [28].

The next step was to reconstitute resolubilized Bax into nanodiscs. This was done by a classical detergent removal approach. A SEC separation allowed to identify fractions that were enriched with Bax-containing nanodiscs over fractions containing empty nanodiscs. Furthermore, we observed that BaxP168A-containing nanodiscs were slightly larger than BaxWT-containing nanodiscs, when observed by DLS. This was next confirmed by TEM observations showing a significant increase of the size of BaxP168A-containing nanodiscs, as compared to BaxWT-containing nanodiscs. Interestingly, the small amount of nanodiscs that were formed during the cell-free expression of His₆-Bax in the presence of StrepII-MSP1E3D1 nanodiscs exhibited the same difference of size distribution between BaxWT and BaxP168A.

As reported previously, BaxP168A spontaneously forms pores in the OMM when it is expressed in yeast [27] or human cells [26]. The recombinant His₆-tagged BaxP168A was slightly but significantly more efficient to form pores in liposomes and isolated mitochondria [28] and, in the present study, we show that the resolubilized proteins was also more active, both on liposomes and mitochondria. Then, for the first time, we can correlate this biochemical properties of BaxP168A to its capacity to form larger objects in membranes.

Although the size of nanodiscs is expected to be limited by the presence of the belt protein MSP1E3D1, they seem to have enough flexibility to adapt to the size of BaxP168A oligomers. It has been shown that the thickness of the lipid bilayer and the density of lipid molecules is not homogenous even in nanodiscs containing only lipids [67]. When a protein is inserted, the shape of nanodiscs may change. For example, nanodiscs having inserted bacteriorhodopsin adopt a squared shape [68]. SAXS measurements show that nanodiscs can also adopt elliptical shapes [69]. It is then likely that the size, and possibly the shape, of BaxP168A oligomers may create physical constraints forcing nanodiscs to adapt their size and shape.

One study has previously reported the reconstitution of Bax in nanodiscs [70]. His₆-Bax was previously activated with a Bid-BH3 peptide and co-formed with DPPC/MSP1E3D1 nanodiscs and observed by cryo-EM. The size and the shape of Bax-containing nanodiscs were different from empty nanodiscs, with a more ellipsoidal shape and the presence of a pore having a diameter of 3.5 nm. The authors assumed that Bax monomers were inserted [71]. However, the treatment of Bax by a Bid-BH3 peptide that was used in this study was later shown to induce the formation of, at least, a Bax dimer [34]. Molecular dynamics

simulations of Bax inserted in nanodiscs have also been done [72]. From these data, the addition of a single Bax protein in the lipid bilayer would be sufficient to trigger the formation of a pore, by reorganizing lipid molecules in the nanodisc in close proximity to Bax, thus forming some empty space as a side effect. However, the conclusion that a monomer, or even a dimer, of Bax is sufficient to form a pore having a size sufficient to permeabilize a membrane to cytochrome *c* is not in line with electrophysiology experiments, in which the formation of Bax oligomers is needed to form the pore [6].

In our experiments, the difference of surface between BaxWT and BaxP168A nanodiscs is about 58nm^2 (considering they are actual discs). The average diameter of an α -helix is about 1.2 nm. Assuming a model where 3 helices are inserted ($\alpha 5$, $\alpha 6$ and $\alpha 9$) and Bax oligomers are formed of 12 monomers [15], the inserted helices would occupy a surface of about 40nm^2 . This would let a surface of about 18nm^2 for the pore (about 4.8 nm in diameter), that is consistent with its expected size calculated from electrophysiology experiments: indeed, the Bax pore is permeable to cytochrome *c* (~ 3 nm in diameter), to ribonuclease A (~ 3.5 nm in diameter), but not to hemoglobin (~ 5 nm in diameter) [6]. Consistently, Guihard *et al* [35] calculated a diameter of 4.6 nm for the Bax pore in liver mitochondria of rats developing fulminant hepatitis. This size is significantly larger than the 3.5 nm pore depicted in Bid-BH3-activated Bax nanodiscs [70–72], that might correspond to an earlier step in the process of the pore formation, before Bax is fully oligomerized. It is noteworthy that a 3.5 nm-pore would be theoretically large enough to permeabilize the membrane to cytochrome *c* [71], but would be very limiting to permeabilize the membrane to smac/diablo, that is released more slowly from mitochondria [37], and may require additional steps, compared to cytochrome *c* [73]. In the case of BaxP168A, which spontaneously forms oligomers [28], the initial steps corresponding to the insertion of a monomer/dimer might be absent, and a full size oligomeric pore would then be formed (Fig. 7).

Even though the BaxP168A pore would be larger than the Bid-BH3-activated Bax pore, it remains much smaller than the large objects forming rings having a diameter of several tenth of nanometers that were observed by high resolution fluorescence microscopy and atomic force microscopy [7,8]. These large objects might correspond to later apoptotic steps, when multiple Bax molecules would come together to form large, unselective holes in the OMM [36], while the “small” pores may correspond to the early steps of apoptosis, when the permeabilization is limited to several apoptogenic factors, namely cytochrome *c* and smac/diablo (Fig. 7). The advantages of nanodiscs is that the size constraints imposed by the scaffold protein may limit the reconstitution, or the formation, of these large objects. On the basis of

data reported in this paper, we will next optimize the method to obtain a higher number of observable objects allowing to determine a faithful 3D structure of BaxP168A oligomers reconstituted in nanodiscs.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR5095 and UMR5248), the Université de Bordeaux (UMR5095 and UMR5248) and the Ligue Régionale contre le Cancer de la Gironde (to S.M. and C.G.). A.R.E. is recipient of a PhD fellowship from the Agence Nationale des Bourses du Gabon. We wish to thank Audrey Boutillier for technical help.

References

- J.M. Adams, S. Cory, The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets, *Cell Death Differ.* 25 (2018) 27–36.
- S. Bleicken, T.E. Assafa, C. Stegmüller, A. Wittig, A.J. Garcia-Saez, E. Bordignon, Topology of active, membrane-embedded bax in the context of a toroidal pore, *Cell Death Differ.* 25 (2018) 1717–1731.
- T. Moldoveanu, P.E. Czabotar, BAX, BAK, and BOK: a coming of age for the BCL-2 family effector proteins, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 12 (2020), a036319.
- A.Z. Spitz, E. Gavathiotis, Physiological and pharmacological modulation of BAX, *Trends Pharmacol. Sci.* 43 (2022) 206–220.
- E.V. Pavlov, M. Priault, D. Pietkiewicz, E.H. Cheng, B. Antonsson, S. Manon, S. J. Korsmeyer, C.A. Mannella, K.W. Kinnally, A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and bax expression in yeast, *J. Cell Biol.* 155 (2001) 725–731.
- L.M. Dejean, S. Martinez-Caballero, L. Guo, C. Hughes, O. Tejjido, T. Ducret, F. Ichas, S.J. Korsmeyer, B. Antonsson, E.A. Jonas, K.W. Kinnally, Oligomeric bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel, *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 2424–2432.
- L. Große, C.A. Wurm, C. Brüser, D. Neumann, D.C. Jans, S. Jakobs, Bax assembles into large ring-like structures remodeling the mitochondrial outer membrane in apoptosis, *EMBO J.* 35 (2016) 402–413.
- R. Salvador-Gallego, M. Mund, K. Cosentino, J. Schneider, J. Unsay, U. Schraermeyer, J. Engelhardt, J. Ries, A.J. García-Sáez, Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores, *EMBO J.* 35 (2016) 389–401.
- M. Suzuki, R.J. Youle, N. Tjandra, Structure of bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization, *Cell* 103 (2000) 645–654.
- T. Kaufmann, S. Schlipf, J. Sanz, K. Neubert, R. Stein, C. Borner, Characterization of the signal that directs bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane, *J. Cell Biol.* 160 (2003) 53–64.
- K. Tremblais, L. Oliver, P. Juin, T.M. Le Cabellec, K. Meflah, F.M. Vallette, The C-terminus of bax is not a membrane addressing/anchoring signal, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260 (1999) 582–591.
- L. Oliver, M. Priault, K. Tremblais, M. LeCabellec, K. Meflah, S. Manon, F. M. Vallette, The substitution of the C-terminus of bax by that of bcl-xL does not affect its subcellular localization but abrogates its pro-apoptotic properties, *FEBS Lett.* 487 (2000) 161–165.
- S. Montessuit, G. Mazzei, E. Magnenat, B. Antonsson, Expression and purification of full-length human bax alpha, *Protein Expr. Purif.* 15 (1999) 202–206.
- M. Saito, S.J. Korsmeyer, P.H. Schlesinger, BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 553–555.
- B. Antonsson, S. Montessuit, S. Lauper, R. Eskes, J.C. Martinou, Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria, *Biochem. J.* 345 (2000) 271–278.
- S.J. Gardai, D.A. Hildeman, S.K. Frankel, B.B. Whitlock, S.C. Frasch, N. Borregaard, P. Marrack, D.L. Bratton, P.M. Henson, Phosphorylation of bax Ser184 by akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 21085–21095.
- M. Xin, X. Deng, Nicotine inactivation of the proapoptotic function of bax through phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 10781–10789.
- J. Kale, O. Kutuk, G.C. Brito, T.S. Andrews, B. Leber, A. Letai, D.W. Andrews, Phosphorylation switches bax from promoting to inhibiting apoptosis thereby increasing drug resistance, *EMBO Rep.* 19 (2018), e45235.
- H. Arokium, H. Ouerfelli, G. Velours, N. Camougrand, F.M. Vallette, S. Manon, Substitutions of potentially phosphorylatable serine residues of bax reveal how they may regulate its interaction with mitochondria, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 35104–35112.
- M. Xin, R. Li, M. Xie, D. Park, T.K. Owonikoko, G.L. Sica, P.E. Corsino, J. Zhou, C. Ding, M.A. White, A.T. Magis, S.S. Ramalingam, W.J. Curran, F.R. Khuri, X. Deng, Small-molecule bax agonists for cancer therapy, *Nat. Commun.* 5 (2014) 4935.
- B. Schellenberg, P. Wang, J.A. Keeble, R. Rodriguez-Enriquez, S. Walker, T. W. Owens, F. Foster, J. Tanianis-Hughes, K. Brennan, C.H. Streuli, A.P. Gilmore, Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming, *Mol. Cell* 49 (2013) 959–971.
- L. Simonyan, T.T. Renault, M.J. Novais, M.J. Sousa, M. Côte-Real, N. Camougrand, C. Gonzalez, S. Manon, Regulation of Bax/mitochondria interaction by AKT, *FEBS Lett.* 590 (2016) 13–21.
- D. Garenne, T.T. Renault, S. Manon, Bax mitochondrial relocation is linked to its phosphorylation and its interaction with bcl-xL, *Microb. Cell.* 3 (2016) 597–605.
- C. Grathwohl, K. Wüthrich, Nmr studies of the rates of proline cis–trans isomerization in oligopeptides, *Biopolymers* 20 (1981) 2623–2633.
- Z.J. Shen, S. Esnault, A. Schinzel, C. Borner, J.S. Malter, The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 facilitates cytokine-induced survival of eosinophils by suppressing bax activation, *Nat. Immunol.* 10 (2009) 257–265.
- P.F. Cartron, H. Arokium, L. Oliver, K. Meflah, S. Manon, F.M. Vallette, Distinct domains control the addressing and the insertion of bax into mitochondria, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 10587–10598.
- H. Arokium, N. Camougrand, F.M. Vallette, S. Manon, Studies of the interaction of substituted mutants of BAX with yeast mitochondria reveal that the C-terminal hydrophobic alpha-helix is a second ART sequence and plays a role in the interaction with anti-apoptotic BCL-xL, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 52566–52573.
- L. Simonyan, A. Légit, I. Lascu, G. Durand, M.F. Giraud, C. Gonzalez, S. Manon, The substitution of proline 168 favors bax oligomerization and stimulates its interaction with LUVs and mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1859 (2017) 1144–1155.
- L. Lalier, P.F. Cartron, P. Juin, S. Nedelkina, S. Manon, B. Bechinger, F.M. Vallette, Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis, *Apoptosis* 12 (2007) 887–896.
- T.P. Garner, D.E. Reyna, A. Priyadarshi, H.C. Chen, S. Li, Y. Wu, Y.T. Ganesan, V. N. Malashkevich, E.H. Cheng, E. Gavathiotis, An autoinhibited dimeric form of BAX regulates the BAX activation pathway, *Mol. Cell* 63 (2016) 485–497.
- A. Schinzel, T. Kaufmann, M. Schuler, J. Martinlbo, D. Grubb, C. Borner, Conformational control of bax localization and apoptotic activity by Pro168, *J. Cell Biol.* 164 (2004) 1021–1032.
- A.J. Valentijn, J.P. Upton, N. Bates, A.P. Gilmore, Bax targeting to mitochondria occurs via both tail anchor-dependent and -independent mechanisms, *Cell Death Differ.* 15 (2008) 1243–1254.
- P.F. Cartron, M. Priault, L. Oliver, K. Meflah, S. Manon, F.M. Vallette, The N-terminal end of bax contains a mitochondrial-targeting signal, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 11633–11641.
- P.E. Czabotar, D. Westphal, G. Dewson, S. Ma, C. Hockings, W.D. Fairlie, E.F. Lee, S. Yao, A.Y. Robin, B.J. Smith, D.C. Huang, R.M. Kluck, J.M. Adams, P.M. Colman, Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis, *Cell* 152 (2013) 519–531.
- G. Guihard, G. Bellot, C. Moreau, G. Pradal, N. Ferry, R. Thomy, P. Fichet, K. Meflah, F.M. Vallette, The mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) corresponds to a late apoptotic event, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 46542–46550.
- S. Martinez-Caballero, L.M. Dejean, M.S. Kinnally, K.J. Oh, C.A. Mannella, K. W. Kinnally, Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 12235–12245.
- S.L. Springs, V.M. Diavolitis, J. Goodhouse, G.L. McLendon, The kinetics of translocation of Smac/DIABLO from the mitochondria to the cytosol in HeLa cells, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 45715–45718.
- X. Roucou, M. Prescott, R.J. Devenish, P. Nagley, A cytochrome c-GFP fusion is not released from mitochondria into the cytoplasm upon expression of bax in yeast cells, *FEBS Lett.* 471 (2000) 235–239.
- I.G. Denisov, S.G. Sligar, Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23 (2016) 481–486.
- I.G. Denisov, Y.V. Grinkova, A.A. Lazarides, S.G. Sligar, Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer nanodiscs with controlled size, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 3477–3487.
- C. Le Bon, B. Michon, J.L. Popot, M. Zoonens, Amphipathic environments for determining the structure of membrane proteins by single-particle electron cryo-microscopy, *Q. Rev. Biophys.* 54, e6.
- F. Katzen, T.C. Peterson, W. Kudlicki, Membrane protein expression: no cells required, *Trends Biotechnol.* 27 (2009) 455–460.
- N. Shadiac, Y. Nagarajan, S. Waters, M. Hrmova, Close allies in membrane protein research: cell-free synthesis and nanotechnology, *Mol. Membr. Biol.* 30 (2013) 229–245.
- O. Rauh, K. Kukovetz, L. Winterstein, B. Introini, G. Thiel, Combining in vitro translation with nanodisc technology and functional reconstitution of channels in planar lipid bilayers, *Methods Enzymol.* 652 (2021) 293–318.
- D. Schwarz, F. Junge, F. Durst, N. Frölich, B. Schneider, S. Reckel, S. Sobhanifar, V. Dötsch, F. Bernhard, Preparative scale expression of membrane proteins in Escherichia coli-based continuous exchange cell-free systems, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 2945–2957.

- [46] P. Davanloo, A.H. Rosenberg, J.J. Dunn, F.W. Studier, Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81 (1984) 2035–2039.
- [47] G. Kudla, S. Montessuit, R. Eskes, C. Berrier, J.C. Martinou, A. Ghazi, B. Antonsson, The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 22713–22718.
- [48] Y. Yao, D. Nisan, L.M. Fujimoto, A. Antignani, A. Barnes, N. Tjandra, R.J. Youle, F. M. Marassi, Characterization of the membrane-inserted C-terminus of cytoprotective BCL-XL, *Protein Expr. Purif.* 122 (2016) 56–63.
- [49] T.T. Renault, K.V. Floros, R. Elkholi, K.A. Corrigan, Y. Kushnareva, S.Y. Wieder, C. Lindtner, M.N. Serasinghe, J.J. Ascioia, C. Buettner, D.D. Newmeyer, J. E. Chipuk, Mitochondrial shape governs BAX-induced membrane permeabilization and apoptosis, *Mol. Cell* 57 (2015) 69–82.
- [50] T. Kuwana, M.R. Mackey, G. Perkins, M.H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneider, D. R. Green, D.D. Newmeyer, Bid, bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane, *Cell* 111 (2002) 331–342.
- [51] L.A. Compton, W.C. Johnson Jr., Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication, *Anal. Biochem.* 155 (1986) 155–167.
- [52] J.G. Lees, A.J. Miles, F. Wien, B.A. Wallace, A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space, *Bioinformatics* 22 (2006) 1955–1962.
- [53] L. Dauray, F. Orange, J.C. Taveau, A. Verchère, L. Monlezun, C. Gounou, R. K. Marreddy, M. Picard, I. Broutin, K.M. Pos, O. Lambert, Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps, *Nat. Commun.* 7 (2016) 10731.
- [54] T.T. Renault, O. Tejjido, F. Missire, Y.T. Ganesan, G. Velours, H. Arokium, F. Beaumatin, R. Llanos, A. Athané, N. Camougrand, M. Priault, B. Antonsson, L. M. Dejean, S. Manon, Bcl-xL stimulates bax relocation to mitochondria and primes cells to ABT-737, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 64 (2015) 136–146.
- [55] Y.T. Hsu, R.J. Youle, Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 13829–13834.
- [56] D. Zhai, C. Jin, Z. Huang, A.C. Satterthwait, J.C. Reed, Differential regulation of bax and bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins bcl-B and Mcl-1, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 9580–9586.
- [57] F. Edlich, S. Banerjee, M. Suzuki, M.M. Cleland, D. Arnoult, C. Wang, A. Neutzner, N. Tjandra, R.J. Youle, Bcl-x(L) retrotranslocates bax from the mitochondria into the cytosol, *Cell* 145 (2011) 104–116.
- [58] F. Gautier, Y. Guillemin, P.F. Cartron, T. Gallenne, N. Cauquil, T. Le Diguarher, P. Casara, F.M. Vallette, S. Manon, J.A. Hickman, O. Geneste, P. Juin, Bax activation by engagement with, then release from, the BH3 binding site of bcl-xL, *Mol. Cell. Biol.* 31 (2011) 832–844.
- [59] J.A. Yethon, R.F. Epand, B. Leber, R.M. Epand, D.W. Andrews, Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in bax normally associated with induction of apoptosis, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 48935–48941.
- [60] G. Bellot, P.F. Cartron, E. Er, L. Oliver, P. Juin, L.C. Armstrong, P. Bornstein, K. Mihara, S. Manon, F.M. Vallette, TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the proapoptotic protein bax, *Cell Death Differ.* 14 (2007) 785–794.
- [61] M. Ott, E. Norberg, K.M. Walter, P. Schreiner, C. Kemper, D. Rapaport, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, The mitochondrial TOM complex is required for tBid/Bax-induced cytochrome c release, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 27633–27639.
- [62] T.T. Renault, X. Grandier-Vazeille, H. Arokium, G. Velours, N. Camougrand, M. Priault, O. Tejjido, L.M. Dejean, S. Manon, The cytosolic domain of human Tom22 modulates human bax mitochondrial translocation and conformation in yeast, *FEBS Lett.* 586 (2012) 116–121.
- [63] P.F. Cartron, G. Bellot, L. Oliver, X. Grandier-Vazeille, S. Manon, F.M. Vallette, Bax inserts into the mitochondrial outer membrane by different mechanisms, *FEBS Lett.* 582 (2008) 3045–3051.
- [64] I.S. Goping, A. Gross, J.N. Lavoie, M. Nguyen, R. Jemmerson, K. Roth, S. J. Korsmeyer, G.C. Shore, Regulated targeting of BAX to mitochondria, *J. Cell Biol.* 143 (1998) 207–215.
- [65] P.F. Cartron, C. Moreau, L. Oliver, E. Mayat, K. Meflah, F.M. Vallette, Involvement of the N-terminus of bax in its intracellular localization and function, *FEBS Lett.* 512 (2002) 95–100.
- [66] P.F. Cartron, L. Oliver, S. Martin, C. Moreau, M.T. LeCabellec, P. Jezequel, K. Meflah, F.M. Vallette, The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule bax, baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 675–687.
- [67] I. Schachter, C. Allolio, G. Khelashvili, D. Harries, Confinement in nanodiscs anisotropically modifies lipid bilayer elastic properties, *J. Phys. Chem. B* 124 (2020) 7166–7175.
- [68] A.Y. Shih, I.G. Denisov, J.C. Phillips, S.G. Sligar, K. Schulten, Molecular dynamics simulations of discoidal bilayers assembled from truncated human lipoproteins, *Biophys. J.* 88 (2005) 548–556.
- [69] N. Skar-Gislinge, J.B. Simonsen, K. Mortensen, R. Feidenhansl, S.G. Sligar, B. Lindberg Møller, T. Bjørnholm, L. Arleth, Elliptical structure of phospholipid bilayer nanodiscs encapsulated by scaffold proteins: casting the roles of the lipids and the protein, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 13713–13722.
- [70] X.P. Xu, D. Zhai, E. Kim, M. Swift, J.C. Reed, N. Volkmann, D. Hanein, Three-dimensional structure of bax-mediated pores in membrane bilayers, *Cell Death Dis.* 4 (2013), e683.
- [71] N. Volkmann, F.M. Marassi, D.D. Newmeyer, D. Hanein, The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis, *Cell Death Differ.* 21 (2014) 206–215.
- [72] C.A. López, M.F. Swift, X.P. Xu, D. Hanein, N. Volkmann, S. Gnanakaran, Biophysical characterization of a nanodisc with and without BAX: an integrative study using molecular dynamics simulations and cryo-EM, *Structure* 27 (2019) 988–999, e4.
- [73] C. Adrain, E.M. Creagh, S.J. Martin, Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2, *EMBO J.* 20 (2001) 6627–6636.

Article

Bcl-xL Is Spontaneously Inserted into Preassembled Nanodiscs and Stimulates Bax Insertion in a Cell-Free Protein Synthesis System

Akandé Rouchidane Eytayo¹, Axel Boudier-Lemosquet¹, Stéphane Chaignepain^{1,2}, Muriel Priault^{1,*} 
and Stéphen Manon^{1,*} 

¹ Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaires, Université de Bordeaux, CNRS, UMR 5095, 33077 Bordeaux, France; akande.rouchidane-eyitayo@ibgc.cnrs.fr (A.R.E.); axel.boudier@ibgc.cnrs.fr (A.B.-L.); stephane.chaignepain@u-bordeaux.fr (S.C.)

² Centre de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux, Université de Bordeaux, 33077 Bordeaux, France

* Correspondence: muriel.priault@ibgc.cnrs.fr (M.P.); manon@ibgc.cnrs.fr (S.M.)

Abstract: The antiapoptotic protein Bcl-xL is a major regulator of cell death and survival, but many aspects of its functions remain elusive. It is mostly localized in the mitochondrial outer membrane (MOM) owing to its C-terminal hydrophobic α -helix. In order to gain further information about its membrane organization, we set up a model system combining cell-free protein synthesis and nanodisc insertion. We found that, contrary to its proapoptotic partner Bax, neosynthesized Bcl-xL was spontaneously inserted into nanodiscs. The deletion of the C-terminal α -helix of Bcl-xL prevented nanodisc insertion. We also found that nanodisc insertion protected Bcl-xL against the proteolysis of the 13 C-terminal residues that occurs during expression of Bcl-xL as a soluble protein in *E. coli*. Interestingly, we observed that Bcl-xL increased the insertion of Bax into nanodiscs, in a similar way to that which occurs in mitochondria. Cell-free synthesis in the presence of nanodiscs is, thus, a suitable model system to study the molecular aspects of the interaction between Bcl-xL and Bax during their membrane insertion.

Keywords: Bcl-xL; Bax; nanodiscs; cell-free synthesis; membrane insertion; MALDI; apoptosis



Citation: Rouchidane Eytayo, A.; Boudier-Lemosquet, A.; Chaignepain, S.; Priault, M.; Manon, S. Bcl-xL Is Spontaneously Inserted into Preassembled Nanodiscs and Stimulates Bax Insertion in a Cell-Free Protein Synthesis System. *Biomolecules* **2023**, *13*, 876. <https://doi.org/10.3390/biom13060876>

Academic Editor: Ladislav Anděra

Received: 29 March 2023

Revised: 10 May 2023

Accepted: 19 May 2023

Published: 23 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Apoptotic programmed cell death is controlled by proteins of the Bcl-2 family (Bcl-2s). These proteins are functionally divided into three subfamilies: antiapoptotic proteins (e.g., Bcl-2 and Bcl-xL), multidomain proapoptotic proteins (Bax, Bak, and Bok), and BH3-only proteins (e.g., Bid, Bim, and Bad) acting as modulators of the two other subfamilies. Altogether, the main function of Bcl-2s is to regulate the permeability of the mitochondrial outer membrane (MOM) to mitochondrial apoptogenic factors (e.g., cytochrome c and Smac/Diablo) that are released during the early steps of apoptosis. Typically, multidomain proapoptotic proteins Bax and Bak form large pores in the MOM, after being activated by BH3-only proteins such as tBid and Bim. This activation is counteracted by antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL through their physical interactions with Bax and Bak. This physical interaction can be prevented by other BH3-only proteins such as Bad (see [1–4] for recent reviews on the function and regulation of Bcl-2s).

A remarkable feature of Bcl-2s is the structural homology that exists between pro- and antiapoptotic proteins. Beyond the sequence homology that characterizes this family in the “Bcl-2 homology domains (BH)”, structural data have shown that the soluble conformations of anti- and proapoptotic proteins are very similar (see [5–8] for reviews). However, this similarity cannot be extended to their membrane conformation. Indeed, proapoptotic proteins Bax and Bak are known to form large oligomers [9–12] that define a pore large enough to allow the passage of apoptogenic factors having sizes between ~3.2 and 4.5 nm [13,14].

This involves several conformational changes that radically reshape the proteins [15–18]. On the contrary, Bcl-2 and Bcl-xL are expected to be anchored in the membrane under the form of monomers through their C-terminal hydrophobic α -helix, with moderate, albeit significant, changes in the conformation of the protein core [19–22].

Both pro- and antiapoptotic members of this family are notably difficult to purify, due to the presence of their C-terminal hydrophobic α -helix and to the moderate capacity of some detergents to stabilize oligomers. Most structural and functional data obtained on purified protein before the year 2000 were obtained on proteins deprived of the C-terminal hydrophobic α -helix. In 2000, recombinant Bax was obtained as an auto-cleavable fusion with intein, which allowed the purification and the NMR structure resolution of the full-length and untagged soluble protein [23]. For long, recombinant Bcl-xL was produced as a soluble protein in *E. coli* and was considered as being “full-length”. However, in 2015, Yao et al. demonstrated that the soluble fraction of Bcl-xL was cleaved between residues 218 and 219, thus removing a large part of the C-terminal α -helix, while the full-length protein was present in inclusion bodies [21]. Structural NMR data on membrane-anchored vs. soluble Bcl-xL led to a reconsideration of the role of the C-terminal α -helix of Bcl-xL, questioning its function as a “passive” membrane anchor. Indeed, long-range conformational changes could connect the membrane insertion of the C-terminal α -helix to movements of other domains of the protein, such as the BH3 domain or the α 1– α 2 loop [22,24]. In addition to its function in Bcl-xL insertion, the C-terminal α -helix of Bcl-xL also has a function in the (co)-retrotranslocation of Bax by Bcl-xL from the MOM to the cytosol [25,26]. Furthermore, post-translational modifications such as phosphorylation [27,28] and deamidation [29,30] regulate the pro-survival functions of Bcl-xL.

Investigations on how Bcl-xL is addressed and inserted into membranes require setting up a robust model that minimizes the time between protein synthesis and insertion. Cell-free protein synthesis in the presence of membrane models such as liposomes or nanodiscs (ND) meets this requirement [31–33]. In the present study, we show that full-length Bcl-xL can be simultaneously synthesized and inserted into nanodiscs, which further stimulates Bax insertion, thus representing a suitable model for further biochemical and structural studies.

2. Materials and Methods

2.1. Cloning of Full-Length Bcl-xL and Bax

Full-length Bcl-xL and Bax were cloned between the Nde1 and Xho1 sites of the piVex 2.3MCS plasmid. A stop codon was introduced to exclude the His₆-tag. The Bcl-xL Δ C(213) mutant was constructed by the Quickchange method with the Phusion polymerase (ThermoFisher, Illkirch, France).

2.2. Production of the Scaffold Protein His₇-MSP1E3D1

The scaffold protein His₇-MSP1E3D1 was produced as described previously [34]. The plasmid pET28b encoding His₇-MSP1E3D1 (Addgene, Watertown, MA, USA) was transformed into *E. coli* BL21DE3 and plated on LB solid medium (0.5% yeast extract, 1% tryptone, 1% NaCl, and 1.5% agar) containing 30 mg/L kanamycin. One isolated colony was pre-grown in LB medium containing 30 mg/L kanamycin overnight at 37 °C. The preculture was inoculated into 1 L of TB medium (2.4% yeast extract, 1.2% tryptone, 0.5% glycerol, and 8.9 mM sodium phosphate buffer; pH 7.0) containing 30 mg/L of kanamycin at OD₆₀₀ = 0.2 and allowed to grow until OD₆₀₀ = 0.9. His₇-MSP1E3D1 expression was induced by adding 1 mM IPTG, and the growth was extended at 37 °C until OD₆₀₀ reached 1.8. Cells were pelleted by centrifugation (4000× *g*, 10 min, 4 °C, Sorvall SLA1500 rotor), and then resuspended in 30 mL of lysis buffer (100 mM Na₂HPO₄, pH 7.6, 50 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM Pic8340 (Proteases inhibitors, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), 1 mM AEBSF, 1% Triton X100, and one tablet of Complete™ EDTA-free). Cells were lysed by sonication (50% pulsation, Power on 7 (max microTip), seven cycles of 30 s of sonication followed by 30 s pause). Cell debris was pelleted by centrifugation

(46,000× *g*, 30 min, 4 °C, Beckman 45Ti rotor). The supernatant was loaded overnight (in a closed circuit on a peristaltic pump) on a Ni-NTA column (HisTrap FF 5 mL, Cytiva, Vélizy-Villacoublay, France) previously equilibrated in lysis buffer. The circuit was opened, and the column was washed sequentially with five volumes of Buffers 1–3 (Buffer 1: 40 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, and 1% Triton X100; Buffer 2: 40 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, and 50 mM sodium cholate; Buffer 3: 40 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, and 50 mM imidazole). The column was then connected to an Äkta purifier and washed with one more volume of Buffer 3. Proteins were eluted with elution buffer (40 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, and 300 mM imidazole). The eluate was then dialyzed against the desalting buffer (10 mM Tris/HCl pH 8.0, and 100 mM NaCl) and concentrated with a Vivaspin concentrator (10 kDa cutoff, Sartorius, Göttingen, Germany). The protein (~7 mg/mL) was stored as working aliquots at –80 °C.

2.3. Nanodisc Formation

Nanodisc preparation was performed as previously described [34]. Briefly, 2.5 mg of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) in chloroform (Anatrace, Maumee, OH, USA) was dried for 3 h under argon flow. The dry lipid film was resolubilized in nanodisc buffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, and 200 mM sodium cholate). Then, 1.5 mg of His₇-MSP1E3D1 was added and left for equilibration for 1 h. Detergent was removed by adding 150 mg of BioBeads SM-2 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) for 3 h. The sample was then centrifuged at 20,000× *g* for 15 min at 4 °C, filtered through a 0.22 µm membrane, and loaded on a SEC column (Superdex 200 10/300GL, Cytiva). SEC was run in the same buffer (without cholate) at 0.5 mL per minute. When needed, nanodiscs were concentrated on Vivaspin with a 30 kDa cutoff (final concentration: 0.2 to 0.4 mM His₇-MSP1E3D1).

Several experiments were conducted with phospholipid mixtures such as *E. coli* polar extract (Avanti 100600C) that mostly contains phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) cardiolipin (CL), and a “mitochondria-like” mixture of POPC, POPE, POPG, POPS, PI, and CL, as described previously [35].

2.4. Cell-Free Protein Synthesis and Protein Insertion into Nanodiscs

Cell-free protein synthesis was conducted as described previously [34] in a small-volume dialysis chamber (100 µL), separated from a feeding reservoir (1700 µL) by a dialysis membrane (MW 10,000 Da). The system was routinely set up in inverted microcentrifuge tubes with the dialysis membrane stuck between the cap containing the reaction mix and the bottom-cut tube containing the feeding mix. Both chambers contained 0.1 M K/HEPES (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.05% NaN₃, 2% PEG 8000, 151 mM potassium acetate, 7.1 mM magnesium acetate, 0.1 mg/mL folinic acid (calcium salt), 2 mM DTT, 1 mM (each) NTP mix, 0.5 mM (each) amino acid mix, 1 mM (each) RDEWCM mix, 20 mM K/PEP, 20 mM acetylphosphate (Li/K salt), and protease inhibitor cocktail (Complete without EDTA, Roche, Basel, Switzerland). The reaction mix was supplemented with components for the synthesis: 35% (*v/v*) S30 *E. coli* BL21DE3 lysate (in 10 mM Tris/acetate buffer, pH 8.2, 14 mM magnesium acetate, 0.6 mM potassium acetate, and 0.5 mM DTT), 0.04 mg/mL pyruvate kinase (Sigma), 15 µg/mL pIVEX plasmid, 0.5 mg/mL tRNA mix (Roche), 6 units/mL T7 RNA polymerase [36] (for the preparation of bacterial lysate and T7 RNA polymerase), and 3 units/mL RNasin (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Depending on the experiments (see results), preformed nanodiscs were added. The synthesis was conducted for 16 h (overnight) at 28 °C under gentle agitation. The reaction mix was centrifuged for 15 min at 20,000× *g* to separate the pellet containing precipitated proteins and the supernatant containing nanodiscs and soluble proteins.

Nanodiscs were purified from supernatants by adding 100 µL of Ni-NTA Sepharose (Qiagen, Courtaboeuf, France) prewashed in the nanodisc buffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, and 100 mM NaCl) and incubated at 4 °C for 15 min. Ni-NTA Sepharose beads were then washed thrice by centrifugation/resuspension with 500 µL of Tris/HCl 10 mM (pH 8.0) and

NaCl 500 mM buffer; bound nanodiscs were then eluted with Tris/HCl 10 mM (pH 8.0), NaCl 100 mM, and imidazole 300 mM.

2.5. MALDI-MS Analysis

For MALDI-MS analyses, Bcl-xL-containing nanodiscs were added as above to Ni-NTA Sepharose (Qiagen) and washed thrice with 10 mM Tris/HCl (pH 8.0) and 500 mM NaCl. Beads were then placed in IP columns (Pierce, Appleton, WI, USA) before adding 200 μ L of the same buffer supplemented with 50 mM sodium cholate to solubilize nanodiscs. Eluted Bcl-xL was then dialyzed thrice against Tris/HCl 20 mM (pH 7.2), NaCl 20 mM, and DTT 5 mM (preventing dimer formation) to eliminate cholate, and then concentrated on Vivaspin (10 kDa cutoff, Sartorius).

Recombinant Bcl-xL expressed in *E. coli* was purified from inclusion bodies, according to [21,37]. The protein was stored in Tris/HCl 20 mM (pH 8.0), NaCl 450 mM, and DTT 10 mM. Before MALDI-MS analyses, the protein was dialyzed twice against Tris/HCl 20 mM (pH 7.2), NaCl 20 mM, and DTT 5 mM.

Dialysis steps are critical to reduce the amount of cholate and NaCl that could later interfere with the co-crystallization of the sample with the matrix. Samples were mixed (1:1 *v/v*) with a matrix solution of sinapic acid (10 mg/mL) in 1:1 (*v/v*) acetonitrile/deionized water with 0.1% trifluoroacetic acid. Each mixture (2 μ L thereof) was dropped on the MALDI target plate using the dried-droplet method. MALDI-MS analyses were carried out on a MALDI-TOF mass spectrometer (Ultraflex III, Bruker, Billerica, MA, USA) used in linear mode. Calibration was achieved using singly charged cytochrome c and myoglobin ions ($[M + H]^+$ + average = 12,361.0 Da and $[M + H]^+$ + average = 16,952.3 Da, respectively) and the gas phase dimer of these proteins ($[2M + H]^+$ + average = 24,720.9 Da and $[2M + H]^+$ + average = 33,903.6 Da, respectively). The mass spectra were acquired by averaging 8000 shots. The spectra were processed (including background subtraction and smoothing) using FlexAnalysis (Bruker). Experimental masses are the averages of two independent measurements.

2.6. Miscellaneous

Tris/glycine and taurine/imidazole SDS-PAGE and Western blots were performed as described previously [38]. Bcl-xL was revealed with rabbit monoclonal antibody E18 (Abcam), His₇-tag was revealed with mouse monoclonal antibody 4E3D10H2/E3 (ThermoFisher), and Bax was revealed with mouse monoclonal antibody 2D2 (Santa-Cruz, Santa Cruz, CA, USA). HRP-coupled secondary antibodies were from Jackson Laboratories, and blots were revealed with Immobilon Forte (Millipore, Burlington, MA, USA). Images were captured with a G-Box digital camera (Syngene, Cambridge, UK) and processed with Image J 1.48v (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>, downloaded 24 May 2019).

3. Results

3.1. Neosynthesized Bcl-xL Is Spontaneously Inserted into Nanodiscs

It is widely acknowledged that Bcl-xL, whether at endogenous levels or overexpressed, is essentially localized in the mitochondrial outer membrane [39]. This is likely due to the presence of a stretch of positively charged residues (termed the “X domain”) located immediately upstream the C-terminal hydrophobic helix, that may stabilize its insertion by interacting with negatively charged lipid polar heads. Indeed, suppressing these positive charges decreased the mitochondrial localization of Bcl-xL, while replacing the homologous sequence of Bcl-2 by the X domain of Bcl-xL increased Bcl-2 mitochondrial localization [39].

Like we previously did for its proapoptotic partner Bax, we set up cell-free protein synthesis of Bcl-xL, in the absence [35] or in the presence [34] of nanodiscs. After the synthesis, reaction mixes were centrifuged at 20,000 \times g to check for the presence of precipitated protein. Whether in the absence or in the presence of nanodiscs, the vast majority of Bcl-xL was found in the supernatant (Figure 1A). This was different from Bax, which remained soluble in the absence of nanodiscs, but precipitated in their presence [34]. Cell-free synthesized

Bcl-xL appeared as several bands. It is now well established that Bcl-xL is the target of nonenzymatic deamidation on residues N52 and N66 located in the unstructured loop between α 1 and α 2 helices [29,30]. Cell-free protein synthesis conditions are likely favorable for Bcl-xL deamidation [37], because of pH (8.0), temperature (28 °C), and duration (16 h).

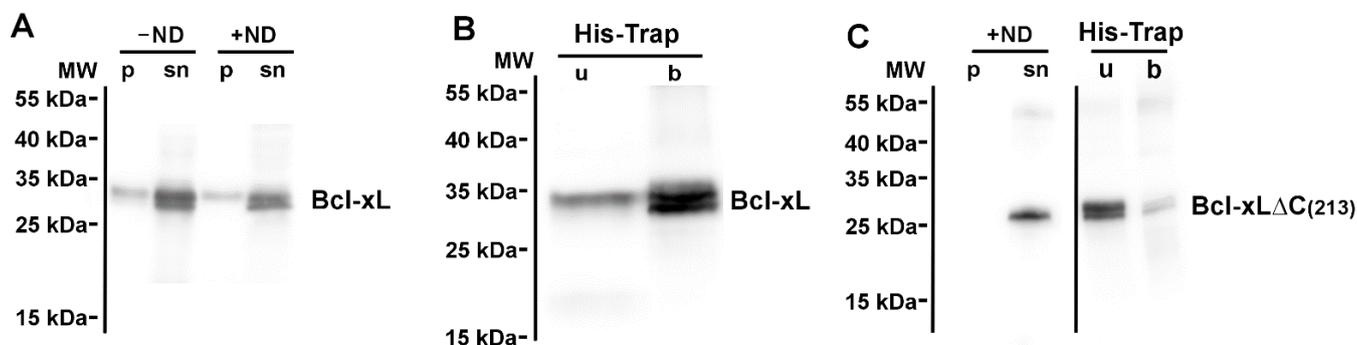


Figure 1. Neosynthesized Bcl-xL is spontaneously inserted into nanodiscs. **(A)** Bcl-xL was synthesized in a cell-free protein synthesis system in the absence (–ND) or in the presence (+ND) of nanodiscs. After a 16 h synthesis, the reaction mix was centrifuged at $20,000\times g$ to separate precipitated proteins (in the pellet, p) and soluble proteins and nanodiscs (in the supernatant, sn). Contrary to its proapoptotic partner Bax [34], the presence of nanodiscs did not induce any precipitation of Bcl-xL. The Western blot is representative of more than 10 independent experiments. **(B)** Supernatant from the reaction mix +ND was incubated with Ni-NTA agarose to bind His₇-tagged MSP1 nanodiscs. After washing, soluble Bcl-xL was found in the unbound fraction (u). After nanodisc elution with imidazole, nanodisc-associated Bcl-xL was found in the bound fraction (b). The Western blot is representative of more than 10 independent experiments. **(C)** The truncated mutant Bcl-xLΔC(213) was produced as in **(A)**, and the association to nanodiscs was measured as in **(B)**. After cell-free synthesis, the protein was present in the supernatant. However, after Ni-NTA binding, it remained in the unbound fraction, showing that it was not associated to nanodiscs. The Western blot is representative of two independent experiments.

Nanodiscs were then purified from the supernatant by affinity chromatography on Ni-NTA. The presence of Bcl-xL was then probed in the flowthrough and bound fractions. We found that Bcl-xL was largely present in the bound fraction, showing that the protein was physically associated with nanodiscs (Figure 1B).

As a negative control, we performed the synthesis of a mutant having a truncation after residue 213, lacking the whole C-terminal α -helix. This deletion was previously shown to impair the mitochondrial localization of Bcl-xL in both mammalian cells [39] and following heterologous expression in yeast cells [26]. We observed that, in the presence of nanodiscs, the truncated mutant Bcl-xLΔC(213) was still recovered in the supernatant; however, contrary to the full-length protein, it was not bound to nanodiscs (Figure 1C). This confirmed that the insertion of Bcl-xL into nanodiscs was dependent on its C-terminal α -helix, which is akin to its insertion into biological membranes [26,39].

3.2. Nanodisc-Inserted Bcl-xL Is Full-Length

When produced as a recombinant protein in *E. coli*, Bcl-xL was present under two forms. The full-length protein was found in inclusion bodies, from which it could be resolubilized via a treatment with chaotropic agents (urea or guanidinium chloride) and further purified and reconstituted into nanodiscs using a co-formation method [21]. Before this study, soluble Bcl-xL was usually isolated from the supernatant, and, until 2015, investigators were unaware that this soluble fraction actually displayed a truncation that removed the 13 C-terminal residues. This mistake was caused by the abnormal migration of Bcl-xL on Tris/glycine SDS-PAGE, making both full-length (233 residues) and truncated (218 residues) Bcl-xL display a similar apparent size. As stated by Yao et al., “the finding that soluble Bcl-xL produced in bacteria is cleaved at the C-terminus impacts the many

biochemical studies performed with recombinant N-terminal-tagged protein, which was presumed to include all C-terminal residues. Thus, effects attributed to the C-terminal tail may need to be reinterpreted in light of C-terminal truncation" [21]. It should be noted that many biochemical studies have been conducted with recombinant Bcl-xL in which the whole C-terminal α -helix was deleted on purpose to facilitate its production as a soluble protein [19,20,40–48]. However, several studies relied on the synthesis of recombinant full-length Bcl-xL purified from *E. coli* lysate-soluble fractions where the C-terminal was likely truncated after residue 218 [46,49–51].

We then tested if cell-free synthesis of Bcl-xL would produce a full-length protein or a truncated form. Bcl-xL truncation by bacterial protease(s) after residue 218 removes two C-terminal positively charged residues (R₂₃₀K₂₃₁), which is expected to change the pI of the protein. Both nanodisc-inserted and non-inserted Bcl-xL were analyzed by IEF, and compared to Bcl-xL produced in *E. coli*, recovered either from inclusion bodies (full-length Bcl-xL) or from the soluble fraction (truncated Bcl-xL). We found that nanodisc-inserted Bcl-xL had a similar pI to Bcl-xL present in inclusion bodies (red line), while non-inserted Bcl-xL had a similar pI to Bcl-xL present in *E. coli* soluble fraction (green line) (Figure 2). This suggested that nanodisc-inserted Bcl-xL was actually full-length, while non-inserted Bcl-xL was truncated. We also noticed the presence of an additional form (blue line) having an intermediate pI between full-length and truncated Bcl-xL (after residue 218), which was present in the non-inserted fraction of cell-free synthesis, but not in bacterial lysates. The nature of this form is unknown, and investigations are underway to determine whether its is due to cleavage at a position other than 218, or to a post-translational modification, such as deamidation [29,30]. Interestingly, we observed that co-producing Bcl-xL with its proapoptotic partner Bax (in the absence of nanodiscs) did not protect Bcl-xL against cleavage, since the full-length form was absent, seemingly increasing the proportion of this unidentified intermediate form compared to the truncated form after residue 218 (Figure 2).

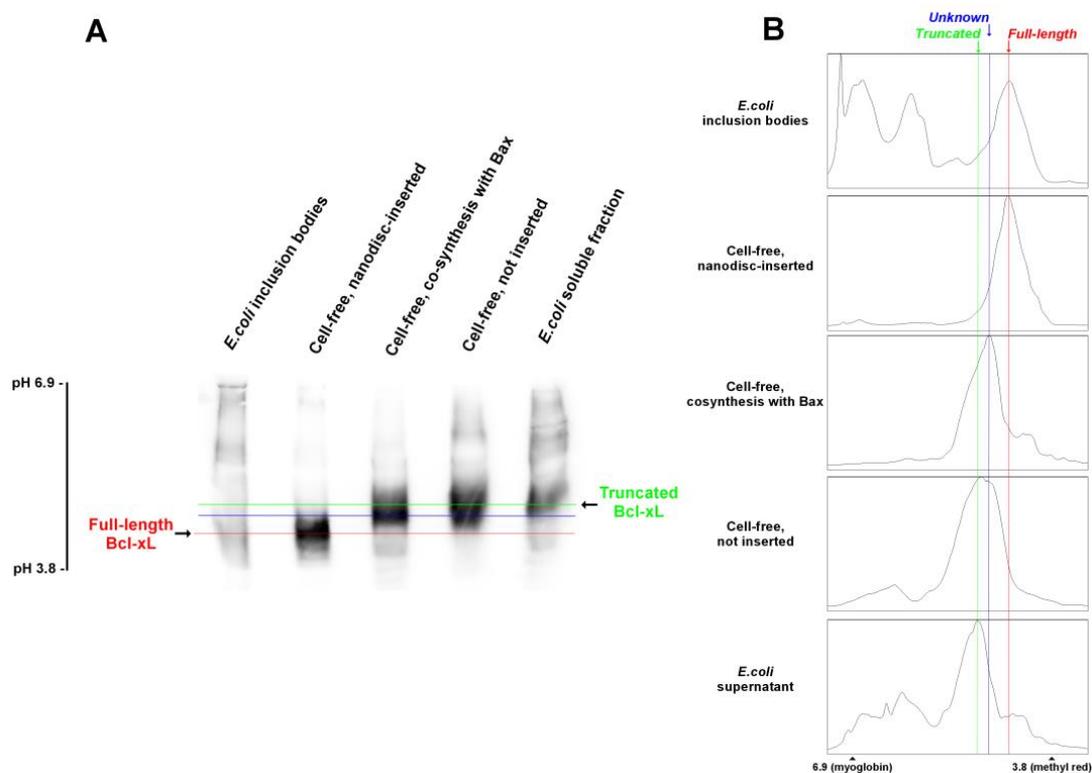


Figure 2. IEF of different forms of recombinant Bcl-xL in different fractions. (A) Different fractions of recombinant Bcl-xL were loaded on isoelectrofocusing (IEF) gels (Thermofisher), according to the manufacturer's instructions. From left to right: Bcl-xL extraction from inclusion

bodies in *E. coli* [21,37]; Bcl-xL produced in cell-free system, inserted into nanodiscs (fraction “b” in Figure 1B); Bcl-xL co-produced in cell-free system with its partner Bax, without nanodiscs [34]; Bcl-xL produced in cell-free system, not inserted into nanodiscs (fraction “u” in Figure 1B); Bcl-xL in the soluble lysate from *E. coli* (classical method, before [21]). The blot is representative of two independent experiments. (B) Densitometry scans of the lanes shown in (A). The red line marks the position of full-length Bcl-xL found in *E. coli* inclusion bodies, which is also found in cell-free synthesized nanodisc-inserted Bcl-xL; the green line marks the position of truncated (after M218) found in *E. coli* soluble fraction (Yao et al., 2016) and in non-inserted cell-free synthesized Bcl-xL. The blue mark corresponds to an unknown form, which might have been generated by truncation at another position or by a post-translational modification such as deamidation. This form was only found in non-inserted cell-free synthesized Bcl-xL, but not in *E. coli* or in nanodisc-inserted cell-free synthesized Bcl-xL.

To further confirm that nanodisc-inserted Bcl-xL was full-length, a MALDI-MS analysis was performed on the protein. Nanodiscs containing Bcl-xL were bound on His-Trap and then solubilized by adding 50 mM sodium cholate. The eluate contained Bcl-xL and was free of His₇-MSP1E3D1 (Figure 3A). It was dialyzed to eliminate cholate and concentrated. MALDI-MS analysis showed that the protein had a mass of 26,046 Da (± 10 Da), close to the theoretical mass of 26,049 Da for the full-length protein (Figure 3B). As a matter of comparison, the full-length protein purified from *E. coli* inclusion bodies was analyzed in parallel and showed two peaks: a major one with a mass of 25,906 Da (± 10 Da) and a minor one with a mass of 26,095 (± 10 Da). The mass difference between the mass measured for nanodisc-inserted Bcl-xL and the mass measured for the main peak of the full-length protein purified from *E. coli* corresponds to 140 Da which is consistent with the mass of the initial methionine. The minor peak observed in the protein purified from inclusion bodies might correspond to the full-length protein including the initial methionine modified by an acetylation (+42 Da).

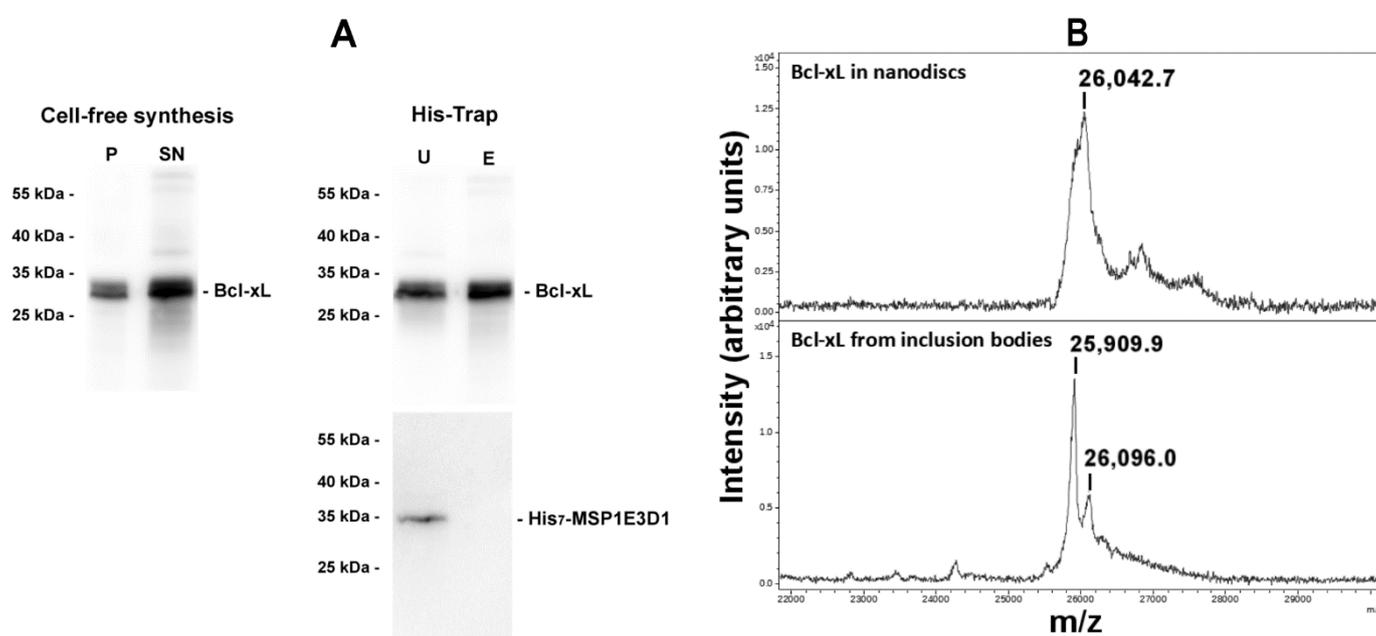


Figure 3. MALDI-MS analysis of Bcl-xL shows that the nanodisc-inserted protein is full-length. (A) Purification of nanodisc-inserted Bcl-xL. Bcl-xL was produced in the cell-free system in the presence of nanodiscs as in Figure 1A (left panel) and then loaded on His-Trap resin (right panel). The unbound fraction was washed (U), and the resin was added with 50 mM cholate to solubilize nanodiscs (E). The “E” fraction contained Bcl-xL but not His₇-MSP1E3D1. (B) MALDI-MS analysis of the “E” fraction from above (top), compared to full-length Bcl-xL purified from inclusion bodies of *E. coli* [21,37] (bottom). Nanodisc-inserted Bcl-xL displayed a major peak at 26,046 Da (± 10 Da)

(mean of two individual measurements), close to the theoretical mass of full-length Bcl-xL (26,049 Da), while Bcl-xL purified from inclusion bodies displayed two peaks at 25,906 Da and 26,095 Da (mean of two individual measurements), close to the theoretical mass of full-length Bcl-xL deprived of the initiation methionine (theoretical mass of 25,917 Da) and to the full-length protein carrying an acetylated methionine (theoretical mass of 26,091 Da), respectively. Note that minor peaks with higher masses in nanodisc-inserted Bcl-xL, might correspond to termination errors of the UGA (opal) codon that might happen in cell-free synthesis.

From these data, we could conclude that Bcl-xL synthesized in cell-free assays and inserted into nanodiscs was full-length, without the truncation of the 13 C-terminal residues [21], which would have generated a protein having a lower mass of 24,811 Da. The large width of the peak and the presence of a shoulder at a lower mass suggest that this methionine was also cleaved in a significant proportion of the protein produced in the cell-free system.

3.3. Bcl-xL Stimulates the Membrane Insertion of Bax into Nanodiscs

We previously reported that the presence of nanodiscs during the cell-free synthesis of Bax induced its partial precipitation, and that the protein was not inserted into nanodiscs [34]. We then tested if the co-synthesis of Bax and Bcl-xL could help Bax insertion. As we previously reported [34], the co-expression of Bcl-xL prevented Bax precipitation in the presence of nanodiscs (Figure 4A). However, Bcl-xL Δ C did not, suggesting that Bcl-xL membrane insertion was needed. We then tested whether Bax and Bcl-xL were actually inserted into nanodiscs. Nanodiscs in the supernatant from the expression of Bax alone or from the co-expression of Bax and Bcl-xL were bound to His-Trap to measure the association of Bax. When expressed alone, Bax was not associated to nanodiscs, whereas, when co-expressed with Bcl-xL, the association of Bax to nanodiscs was significantly increased since about half of the protein was in the bound fraction (Figure 4C,D). As when expressed alone (Figure 1), Bcl-xL was almost completely bound to nanodiscs (Figure 4C).

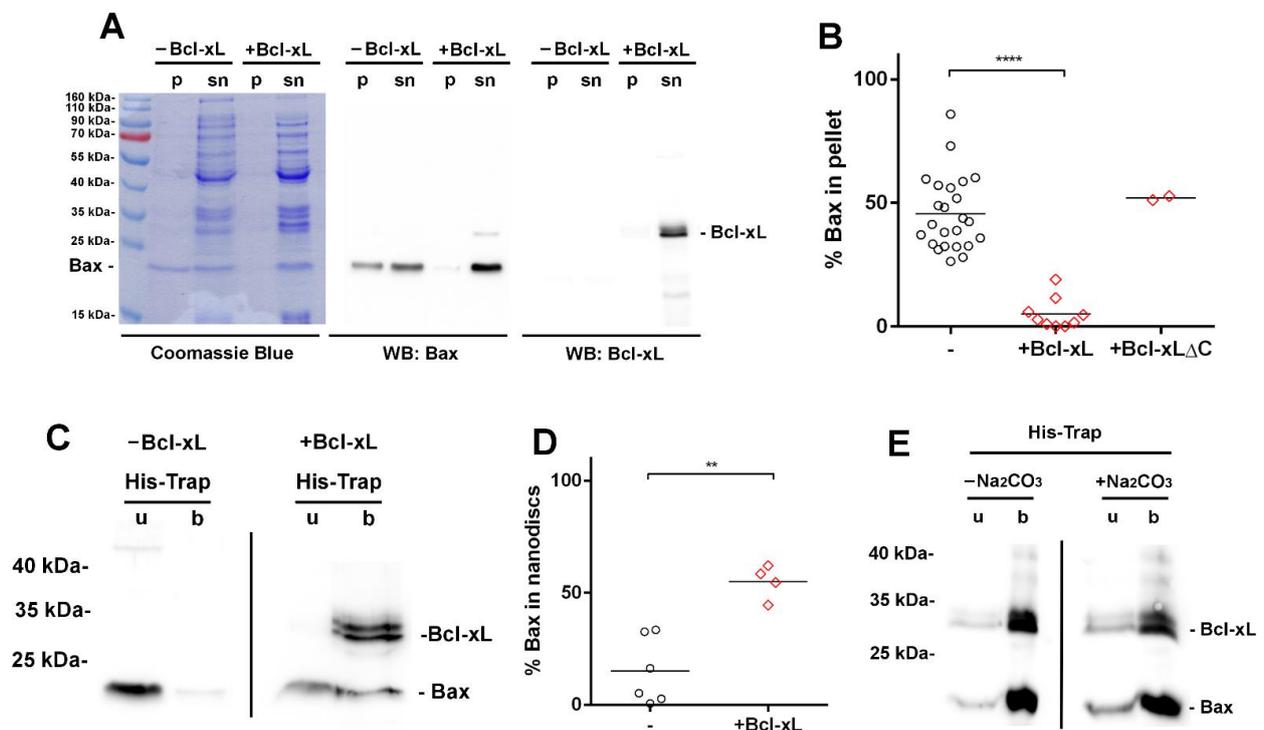


Figure 4. Effect of Bcl-xL on Bax membrane insertion. (A) Bax was expressed alone (−Bcl-xL) or co-expressed with Bcl-xL (+Bcl-xL) in the presence of nanodiscs. After the synthesis, the reaction mix

was centrifuged at $20,000 \times g$ (10 min) to recover a pellet (p) containing precipitated proteins and a supernatant (sn) containing soluble proteins and nanodiscs. We observed that Bcl-xL prevented the partial precipitation of Bax. **(B)** Quantification of the effect of Bcl-xL and Bcl-xL $\Delta C_{(213)}$ on Bax precipitation. Non-saturated Western blots obtained in (A) were quantified with Image J. Column statistics: -Bcl-xL: 45.5 ± 14.9 (SD) ($n = 24$), +Bcl-xL: 5.1 ± 6.3 (SD) ($n = 9$), +Bcl-xL ΔC : 52.0 ± 1.2 ($n = 2$); **** $p < 0.0001$. **(C)** Nanodiscs from the expression of Bax alone (-Bcl-xL) or from the co-expression of Bax and Bcl-xL (+Bcl-xL) were bound to His-Trap. The bound fraction (b) contained proteins associated to nanodiscs, while the unbound fraction (u) contained soluble proteins. The co-expression with Bcl-xL induced the partial association of Bax to nanodiscs. **(D)** Quantification of the effect of Bcl-xL on Bax interaction with nanodiscs. Non-saturated Western blots obtained in (C) were quantified with Image J. Column statistics: -Bcl-xL: 15.1 ± 14.9 ($n = 6$), +Bcl-xL: 54.9 ± 7.6 ($n = 4$); ** $p < 0.01$. **(E)** Nanodiscs from the Bax/Bcl-xL co-expression were purified on His-Trap **(B)**, treated or not with 0.1 M sodium carbonate (pH 10.0; 10 min), and repurified on His-Trap. The unbound fraction (u) contained proteins loosely interacting with nanodiscs, while the bound fraction (b) contained membrane-inserted proteins. The vast majority of Bcl-xL and Bax proteins were membrane-inserted.

Nanodiscs from the Bax/Bcl-xL co-expression were then treated with sodium carbonate to measure the insertion of both proteins. Both proteins remained associated to nanodiscs, before or after the treatment, showing that they were actually inserted into nanodiscs (Figure 4E). This stimulation of Bax membrane insertion by Bcl-xL is in line with previous observations showing that the overexpression of Bcl-xL increased Bax localization and insertion into the MOM of yeast cells, mouse fetal liver cells FL5.12, and human colorectal cancer cells HCT-116 [26].

4. Discussion

We showed that Bcl-xL could be produced in a cell-free system in the presence of nanodiscs, under conditions where the protein was efficiently inserted (Figure 1). Once inserted, the protein was protected from the cleavage that occurs in *E. coli* (Figures 2 and 3). It may be noted that, in spite of the presence of protease inhibitors, the cleavage likely occurred in the lysate since the migration of non-inserted Bcl-xL on IEF was similar to the migration of the protein recovered from the soluble fraction of lysed *E. coli* cells, and it was different from the migration of the nanodisc-inserted protein and the protein recovered from *E. coli* inclusion bodies (Figure 2). Interestingly, the co-expression of Bcl-xL with Bax allowed the latter to be inserted into nanodiscs, while Bax was not inserted when expressed alone (Figure 4). This parallels the effect of Bcl-xL overexpression on Bax mitochondrial insertion in yeast and mammalian cells [26].

Since their description in the early 2000s [52], nanodiscs have been widely used to reconstitute membrane proteins, mainly for structural studies. Contrary to detergents, they provide a true membrane environment, and they are far more stable and homogenous in size than liposomes (see [53,54] for reviews). Their size can be adjusted through the use of different MSP variants, whereby the His₇ tag facilitates nanodisc purification to homogeneity. However, contrary to liposomes, they do not delimitate two compartments and, thus, cannot be used for transport studies.

Nanodiscs have been already used for structural NMR studies on Bcl-xL [55,56]. In the first study [55], Bcl-xL was deprived of the $\alpha 1$ - $\alpha 2$ loop (residues 45–84) to facilitate its purification. In the second study [56], the protein was actually full-length (including the C-terminal α -helix) since it was purified from inclusion bodies. However, the purification followed a denaturing protocol, using reverse-phase HPLC. In a more recent study, the same group produced full-length Bcl-xL as a C-terminal fusion with intein that was non-denaturing and kept the C-terminus of Bcl-xL intact [22], a method previously used by others [57,58]. In all these studies, Bcl-xL was first purified, and then reconstituted in nanodiscs using a co-formation protocol. To our knowledge, our work is the first exam-

ple of Bcl-xL being spontaneously inserted into nanodiscs, thus limiting conformational alterations that may occur during the purification process.

Bcl-xL's proapoptotic partner Bax has also been reconstituted in nanodiscs. A tBid-activated monomer (or dimer) was shown to generate a lipidic pore in nanodiscs [59,60]. We recently reconstituted a constitutively active mutant under an oligomeric form [34]. In both studies, Bax was purified before being reconstituted in nanodiscs via co-formation. In the present study, owing to the presence of Bcl-xL, Bax could be directly inserted into preformed nanodiscs, and likely displays a conformation that might be similar to its conformation in cancer cells, where Bcl-xL is overexpressed and both proteins are inserted together into the MOM, as an inactive heterodimer [26]. This setup will be further used to get more precise insight into which residues/domains of the proteins are involved in their interaction in membranes. It is known that, for example, Bcl-xL-G138 and Bax-G67 are involved in their interactions in solution since replacements by larger residues break their interaction [61,62]. Furthermore, the C-terminal residues of Bcl-xL are required for Bcl-xL-mediated Bax retrotranslocation [25], but not for Bcl-xL-mediated Bax/MOM translocation [26]. The combination of cell-free Bax/Bcl-xL co-synthesis in the presence of nanodiscs with site-directed mutagenesis on both proteins will allow a better understanding of how they interact during these processes of translocation, retrotranslocation, and membrane insertion.

Author Contributions: Conceptualization, A.R.E. and S.M.; methodology, validation, analysis, and investigation, A.R.E., A.B.-L., S.C., M.P. and S.M.; writing—original draft preparation, A.R.E. and S.M.; writing—review and editing, A.R.E., S.C., M.P. and S.M.; supervision, M.P. and S.M.; funding acquisition, S.M., S.C. and M.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université de Bordeaux (SBM department AO3, to S.M. and S.C.), the Agence Nationale pour la Recherche (WrinXL to M.P.), and the Ligue Régionale contre le Cancer, comité Gironde (LS 249487 to S.M.). A.R.E. is recipient of a PhD fellowship from the Agence Nationale des Bourses du Gabon, and A.B.-L. is recipient of a PhD fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Birkinshaw, R.W.; Czabotar, P.E. The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *72*, 152–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kale, J.; Osterlund, E.J.; Andrews, D.W. BCL-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 65–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Popgeorgiev, N.; Jabbour, L.; Gillet, G. Subcellular Localization and Dynamics of the Bcl-2 Family of Proteins. *Front. Cell Dev. Biol.* **2018**, *6*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Green, D.R. The Mitochondrial Pathway of Apoptosis Part II: The BCL-2 Protein Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2022**, *14*, a041046. [[CrossRef](#)]
5. Petros, A.M.; Olejniczak, E.T.; Fesik, S.W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1644*, 83–94. [[CrossRef](#)]
6. Youle, R.J.; Strasser, A. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 47–59. [[CrossRef](#)]
7. Billen, L.P.; Shamas-Din, A.; Andrews, D.W. Bid: A Bax-like BH3 protein. *Oncogene* **2008**, *27* (Suppl. S1), S93–S104. [[CrossRef](#)]
8. Kvensakul, M.; Hinds, M.G. Structural biology of the Bcl-2 family and its mimicry by viral proteins. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e909. [[CrossRef](#)]
9. Antonsson, B.; Montessuit, S.; Lauper, S.; Eskes, R.; Martinou, J.C. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.* **2000**, *345 Pt 2*, 271–278. [[CrossRef](#)]
10. Antonsson, B.; Montessuit, S.; Sanchez, B.; Martinou, J.C. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11615–11623. [[CrossRef](#)]
11. Annis, M.G.; Soucie, E.L.; Dlugosz, P.J.; Cruz-Aguado, J.A.; Penn, L.Z.; Leber, B.; Andrews, D.W. Bax forms multispanning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J.* **2005**, *24*, 2096–2103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Bleicken, S.; Classen, M.; Padmavathi, P.V.; Ishikawa, T.; Zeth, K.; Steinhoff, H.J.; Bordignon, E. Molecular details of Bax activation, oligomerization, and membrane insertion. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 6636–6647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pavlov, E.V.; Priault, M.; Pietkiewicz, D.; Cheng, E.H.; Antonsson, B.; Manon, S.; Korsmeyer, S.J.; Mannella, C.A.; Kinnally, K.W. A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J. Cell Biol.* **2001**, *155*, 725–731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dejean, L.M.; Martinez-Caballero, S.; Guo, L.; Hughes, C.; Teijido, O.; Ducret, T.; Ichas, F.; Korsmeyer, S.J.; Antonsson, B.; Jonas, E.A.; et al. Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 2424–2432. [[CrossRef](#)]
15. Hsu, Y.T.; Youle, R.J. Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 13829–13834. [[CrossRef](#)]
16. Peyerl, F.W.; Dai, S.; Murphy, G.A.; Crawford, F.; White, J.; Marrack, P.; Kappler, J.W. Elucidation of some Bax conformational changes through crystallization of an antibody-peptide complex. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 447–452. [[CrossRef](#)]
17. Czabotar, P.E.; Westphal, D.; Dewson, G.; Ma, S.; Hockings, C.; Fairlie, W.D.; Lee, E.F.; Yao, S.; Robin, A.Y.; Smith, B.J.; et al. Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* **2013**, *152*, 519–531. [[CrossRef](#)]
18. Bloch, N.B.; Wales, T.E.; Prew, M.S.; Levy, H.R.; Engen, J.R.; Walensky, L.D. The conformational stability of pro-apoptotic BAX is dictated by discrete residues of the protein core. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4932. [[CrossRef](#)]
19. Muchmore, S.W.; Sattler, M.; Liang, H.; Meadows, R.P.; Harlan, J.E.; Yoon, H.S.; Nettlesheim, D.; Chang, B.S.; Thompson, C.B.; Wong, S.L.; et al. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **1996**, *381*, 335–341. [[CrossRef](#)]
20. Rajan, S.; Choi, M.; Baek, K.; Yoon, H.S. Bh3 induced conformational changes in Bcl-XL revealed by crystal structure and comparative analysis. *Proteins* **2015**, *83*, 1262–1272. [[CrossRef](#)]
21. Yao, Y.; Nisan, D.; Fujimoto, L.M.; Antignani, A.; Barnes, A.; Tjandra, N.; Youle, R.J.; Marassi, F.M. Characterization of the membrane-inserted C-terminus of cytoprotective BCL-XL. *Protein. Expr. Purif.* **2016**, *122*, 56–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ryzhov, P.; Tian, Y.; Yao, Y.; Bobkov, A.A.; Im, W.; Marassi, F.M. Conformational States of the Cytoprotective Protein Bcl-xL. *Biophys. J.* **2020**, *119*, 1324–1334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Suzuki, M.; Youle, R.J.; Tjandra, N. Structure of Bax: Coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **2000**, *103*, 645–654. [[CrossRef](#)]
24. Vasquez-Montes, V.; Vargas-Uribe, M.; Pandey, N.K.; Rodnin, M.V.; Langen, R.; Ladokhin, A.S. Lipid-modulation of membrane insertion and refolding of the apoptotic inhibitor Bcl-xL. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **2019**, *1867*, 691–700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Todt, F.; Kahir, Z.; Reichenbach, F.; Youle, R.J.; Edlich, F. The C-terminal helix of Bcl-x(L) mediates Bax retrotranslocation from the mitochondria. *Cell Death Differ.* **2013**, *20*, 333–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Renault, T.T.; Teijido, O.; Missire, F.; Ganesan, Y.T.; Velours, G.; Arokium, H.; Beaumatin, F.; Llanos, R.; Athané, A.; Camougrand, N.; et al. Bcl-xL stimulates Bax relocation to mitochondria and primes cells to ABT-737. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2015**, *64*, 136–146. [[CrossRef](#)]
27. Upreti, M.; Galitovskaya, E.N.; Chu, R.; Tackett, A.J.; Terrano, D.T.; Granell, S.; Chambers, T.C. Identification of the major phosphorylation site in Bcl-xL induced by microtubule inhibitors and analysis of its functional significance. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 35517–35525. [[CrossRef](#)]
28. Baruah, P.S.; Beauchemin, M.; Hébert, J.; Bertrand, R. Dynamic Bcl-xL (S49) and (S62) Phosphorylation/Dephosphorylation during Mitosis Prevents Chromosome Instability and Aneuploidy in Normal Human Diploid Fibroblasts. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0159091. [[CrossRef](#)]
29. Deverman, B.E.; Cook, B.L.; Manson, S.R.; Niederhoff, R.A.; Langer, E.M.; Rosová, I.; Kulans, L.A.; Fu, X.; Weinberg, J.S.; Heinecke, J.W.; et al. Bcl-xL deamidation is a critical switch in the regulation of the response to DNA damage. *Cell* **2002**, *111*, 51–62. [[CrossRef](#)]
30. Beaumatin, F.; El Dhaybi, M.; Lasserre, J.P.; Salin, B.; Moyer, M.P.; Verdier, M.; Manon, S.; Priault, M. N52 monodeamidated Bcl-xL shows impaired oncogenic properties in vivo and in vitro. *Oncotarget* **2016**, *7*, 17129–17143. [[CrossRef](#)]
31. Rues, R.B.; Gräwe, A.; Henrich, E.; Bernhard, F. Membrane Protein Production in E. coli Lysates in Presence of Preassembled Nanodiscs. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1586*, 291–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Köck, Z.; Ermel, U.; Martin, J.; Morgner, N.; Frangakis, A.S.; Dötsch, V.; Hilger, D.; Bernhard, F. Biochemical Characterization of Cell-free Synthesized Human β 1 Adrenergic Receptor Cotranslationally Inserted into Nanodiscs. *J. Mol. Biol.* **2022**, *434*, 167687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Levin, R.; Köck, Z.; Martin, J.; Zangl, R.; Gewering, T.; Schüler, L.; Moeller, A.; Dötsch, V.; Morgner, N.; Bernhard, F. Cotranslational assembly of membrane protein/nanoparticles in cell-free systems. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2022**, *1864*, 184017. [[CrossRef](#)]
34. Rouchidane Eytayo, A.; Giraud, M.F.; Daury, L.; Lambert, O.; Gonzalez, C.; Manon, S. Cell-free synthesis and reconstitution of Bax in nanodiscs: Comparison between wild-type Bax and a constitutively active mutant. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2023**, *1865*, 184075. [[CrossRef](#)]
35. Simonyan, L.; Légiot, A.; Lascu, I.; Durand, G.; Giraud, M.F.; Gonzalez, C.; Manon, S. The substitution of Proline 168 favors Bax oligomerization and stimulates its interaction with LUVs and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2017**, *1859*, 1144–1155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Schwarz, D.; Junge, F.; Durst, F.; Frölich, N.; Schneider, B.; Reckel, S.; Sobhanifar, S.; Dötsch, V.; Bernhard, F. Preparative scale expression of membrane proteins in Escherichia coli-based continuous exchange cell-free systems. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2945–2957. [[CrossRef](#)]
37. Boudier-Lemosquet, A.; Mahler, A.; Bobo, C.; Moreau, V.; Priault, M. 1D continuous gel electrophoresis composition for the separation of deamidated proteins. *Methods* **2022**, *200*, 23–30. [[CrossRef](#)]
38. Bobo, C.; Céré, C.; Dufossée, M.; Dautant, A.; Moreau, V.; Manon, S.; Beaumatin, F.; Priault, M. Improved Electrophoretic Separation to Assist the Monitoring of Bcl-xL Post-Translational Modifications. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5571. [[CrossRef](#)]
39. Kaufmann, T.; Schlipf, S.; Sanz, J.; Neubert, K.; Stein, R.; Borner, C. Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* **2003**, *160*, 53–64. [[CrossRef](#)]
40. Minn, A.J.; Vélez, P.; Schendel, S.L.; Liang, H.; Muchmore, S.W.; Fesik, S.W.; Fill, M.; Thompson, C.B. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* **1997**, *385*, 353–357. [[CrossRef](#)]
41. Bossy-Wetzel, E.; Green, D.R. Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17484–17490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Degterev, A.; Lugovskoy, A.; Cardone, M.; Mulley, B.; Wagner, G.; Mitchison, T.; Yuan, J. Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 173–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Jonas, E.A.; Hickman, J.A.; Chachar, M.; Polster, B.M.; Brandt, T.A.; Fannjiang, Y.; Ivanovska, I.; Basañez, G.; Kinnally, K.W.; Zimmerberg, J.; et al. Proapoptotic N-truncated BCL-xL protein activates endogenous mitochondrial channels in living synaptic terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13590–13595. [[CrossRef](#)]
44. Thai, K.; Choi, J.; Franzin, C.M.; Marassi, F.M. Bcl-XL as a fusion protein for the high-level expression of membrane-associated proteins. *Protein Sci.* **2005**, *14*, 948–955. [[CrossRef](#)]
45. Chipuk, J.E.; Bouchier-Hayes, L.; Kuwana, T.; Newmeyer, D.D.; Green, D.R. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* **2005**, *309*, 1732–1735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. O’Neill, J.W.; Manion, M.K.; Maguire, B.; Hockenbery, D.M. BCL-XL dimerization by three-dimensional domain swapping. *J. Mol. Biol.* **2006**, *356*, 367–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Malia, T.J.; Wagner, G. NMR structural investigation of the mitochondrial outer membrane protein VDAC and its interaction with antiapoptotic Bcl-xL. *Biochemistry* **2007**, *46*, 514–525. [[CrossRef](#)]
48. Gautier, F.; Guillemain, Y.; Cartron, P.F.; Gallenne, T.; Cauquil, N.; Le Diguarher, T.; Casara, P.; Vallette, F.M.; Manon, S.; Hickman, J.A.; et al. Bax activation by engagement with, then release from, the BH3 binding site of Bcl-xL. *Mol. Cell Biol.* **2011**, *31*, 832–844. [[CrossRef](#)]
49. Tan, Y.J.; Beerheide, W.; Ting, A.E. Biophysical characterization of the oligomeric state of Bax and its complex formation with Bcl-XL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *255*, 334–339. [[CrossRef](#)]
50. Vander Heiden, M.G.; Li, X.X.; Gottlieb, E.; Hill, R.B.; Thompson, C.B.; Colombini, M. Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 19414–19419. [[CrossRef](#)]
51. Bleicken, S.; Hofhaus, G.; Ugarte-Urbe, B.; Schröder, R.; García-Sáez, A.J. cBid, Bax and Bcl-xL exhibit opposite membrane remodeling activities. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2121. [[CrossRef](#)]
52. Denisov, I.G.; Grinkova, Y.V.; Lazarides, A.A.; Sligar, S.G. Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3477–3487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Denisov, I.G.; Sligar, S.G. Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 481–486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sligar, S.G.; Denisov, I.G. Nanodiscs: A toolkit for membrane protein science. *Protein Sci.* **2021**, *30*, 297–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Yao, Y.; Fujimoto, L.M.; Hirshman, N.; Bobkov, A.A.; Antignani, A.; Youle, R.J.; Marassi, F.M. Conformation of BCL-XL upon Membrane Integration. *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 2262–2270. [[CrossRef](#)]
56. Follis, A.V.; Llambi, F.; Kalkavan, H.; Yao, Y.; Phillips, A.H.; Park, C.G.; Marassi, F.M.; Green, D.R.; Kriwacki, R.W. Regulation of apoptosis by an intrinsically disordered region of Bcl-xL. *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14*, 458–465. [[CrossRef](#)]
57. Yethon, J.A.; Epand, R.F.; Leber, B.; Epand, R.M.; Andrews, D.W. Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 48935–48941. [[CrossRef](#)]
58. Billen, L.P.; Kokoski, C.L.; Lovell, J.F.; Leber, B.; Andrews, D.W. Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol.* **2008**, *6*, e147. [[CrossRef](#)]
59. Xu, X.P.; Zhai, D.; Kim, E.; Swift, M.; Reed, J.C.; Volkmann, N.; Hanein, D. Three-dimensional structure of Bax-mediated pores in membrane bilayers. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e683. [[CrossRef](#)]
60. López, C.A.; Swift, M.F.; Xu, X.P.; Hanein, D.; Volkmann, N.; Gnanakaran, S. Biophysical Characterization of a Nanodisc with and without BAX: An Integrative Study Using Molecular Dynamics Simulations and Cryo-EM. *Structure* **2019**, *27*, 988–999.e4. [[CrossRef](#)]
61. Sedlak, T.W.; Oltvai, Z.N.; Yang, E.; Wang, K.; Boise, L.H.; Thompson, C.B.; Korsmeyer, S.J. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7834–7838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Meijerink, J.P.; Smetsers, T.F.; Sløetjes, A.W.; Linders, E.H.; Mensink, E.J. Bax mutations in cell lines derived from hematological malignancies. *Leukemia* **1995**, *9*, 1828–1832. [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Titre : L'insertion membranaire de la protéine pro-apoptotique Bax est un processus multi-étapes dépendant de TOM22

Résumé : L'apoptose est le processus par lequel les cellules animales s'autodétruisent en réponse à un signal de mort (par exemple, des dommages à l'ADN). La voie intrinsèque est contrôlée par les protéines de la famille de Bcl-2. Parmi elles, la protéine multidomaine pro-apoptotique Bax joue un rôle central. Bax est présent dans une conformation inactive dans les cellules non apoptotiques. Après un signal apoptotique, Bax est activé et relocalisé vers la membrane externe de la mitochondrie (MOM), où il s'oligomérisé pour former un pore de grande taille qui favorise la libération de plusieurs facteurs apoptogènes (par exemple le cytochrome c), qui contribuent à l'activation en aval des caspases. En solution, Bax est organisé en 9 hélices α . Dans sa conformation soluble, l'hélice $\alpha 9$ hydrophobe est stabilisée dans un sillon hydrophobe formé par les 3 domaines BH de la protéine. Le processus d'insertion et d'oligomérisation de Bax dans la MOM reste mal compris. Contrairement à ses partenaires antiapoptotiques (Bcl-2 et Bcl-xL) qui ont une séquence d'ancrage dans la MOM à leurs extrémités C-terminales, ce même domaine chez Bax est important pour maintenir la forme soluble de la protéine. Il est donc important de comprendre comment Bax perméabilise sélectivement la MOM lorsque l'apoptose est induite. Il a été montré que lorsque l'apoptose est induite, l'adressage de Bax dans la MOM dépend de la présence de TOM22 (une sous-unité du complexe d'importation des protéines mitochondriales TOM). Les mécanismes d'adressage et d'insertion de Bax dans la MOM restent cependant mal connus. Dans ce travail, nous avons mis en place un système acellulaire pour étudier les mécanismes sous-tendant la translocation, l'insertion et l'oligomérisation de Bax dans un modèle membranaire simple, les nanodisques. Nos résultats montrent que l'insertion de Bax dans les nanodisques est un processus multi-étapes impliquant deux changements conformationnels successifs, l'exposition d'un domaine hydrophobe dans l'hélice $\alpha 1$, et le dégagement de l'hélice $\alpha 9$ conduisant à l'insertion de la protéine dans la bicouche lipidique. La bicouche lipidique induit le premier changement conformationnel permettant ainsi l'interaction avec TOM22 qui induit le second changement conformationnel. Des expériences de biochimie et de microscopie électronique à transmission ont montré que ce mode d'insertion conduit à la formation d'un oligomère actif de Bax. Nous avons également mis en évidence un second mode d'insertion de Bax impliquant une co-insertion avec son partenaire anti-apoptotique Bcl-xL sous-forme d'un hétérodimère inactif. Il a été précédemment établi que l'action des molécules BH3 mimétiques utilisées en thérapies anticancéreuses était suffisante pour activer Bax et donc rétablir l'apoptose. Nos données montrent que même après l'action des BH3 mimétiques, la perméabilisation de la MOM par Bax reste dépendante de TOM22, suggérant ainsi que les effets des molécules BH3 mimétiques pourraient être potentialisés par des molécules mimant l'effet de TOM22 sur Bax.

Mots clés : Bax, TOM22, synthèse protéique *in vitro*, Nanodisques, Mitochondries, Apoptose, Bcl-xL,

Title : Membrane insertion of the pro-apoptotic protein Bax is a TOM22-dependent process

Abstract : Apoptosis is the process by which animal cells self-destruct in response to a death signal (e.g. DNA damage). The intrinsic pathway is controlled by proteins in the Bcl-2 family. Among these, the pro-apoptotic multidomain protein Bax plays a central role. Bax is present in an inactive conformation in non-apoptotic cells. Following an apoptotic signal, Bax is activated and relocated to the mitochondrial outer membrane (MOM), where it oligomerises to form a large pore that promotes the release of several apoptogenic factors (e.g. cytochrome c), which contribute to the downstream activation of caspases. In solution, Bax is organised into 9 α -helices. In its soluble conformation, the hydrophobic $\alpha 9$ helix is stabilised in a hydrophobic groove formed by the protein's 3 BH domains. The process of insertion and oligomerisation of Bax into MOM remains poorly understood. Unlike its anti-apoptotic partners (Bcl-2 and Bcl-xL) which have an anchoring sequence in the MOM at their C-terminal ends, this same domain in Bax is important for maintaining the soluble form of the protein. It is therefore important to understand how Bax selectively permeabilises MOM when apoptosis is induced. It has been shown that when apoptosis is induced, the addressing of Bax in the MOM depends on the presence of TOM22 (a subunit of the TOM mitochondrial protein import complex). However, the mechanisms by which Bax is addressed and inserted into the MOM remain poorly understood. In this work, we set up a cell-free system to study the mechanisms underlying the translocation, insertion and oligomerisation of Bax in a simple membrane model, nanodiscs. Our results show that the insertion of Bax into nanodiscs is a multi-step process involving two successive conformational changes, the exposure of a hydrophobic domain in helix $\alpha 1$, and the release of helix $\alpha 9$ leading to the insertion of the protein into the lipid bilayer. The lipid bilayer induces the first conformational change allowing interaction with TOM22 which induces the second conformational change. Biochemical and transmission electron microscopy experiments have shown that this mode of insertion leads to the formation of an active Bax oligomer. We also demonstrated a second mode of Bax insertion involving co-insertion with its anti-apoptotic partner Bcl-xL in the form of an inactive heterodimer. It has previously been established that the action of BH3 mimetics used in cancer therapy was sufficient to activate Bax and thus restore apoptosis. Our data show that even after the action of BH3 mimetics, MOM permeabilisation by Bax remains dependent on TOM22, suggesting that the effects of BH3 mimetics could be potentiated by molecules that mimic the effect of TOM22 on Bax.

Keywords : Bax, TOM22, Cell-free protein synthesis, Nanodiscs, Mitochondria, Apoptosis, Bcl-xL

Unité de recherche

Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaires (IBGC) UMR5095 CNRS & Université de Bordeaux Campus Carreire,
CS61390 1 Rue Camille Saint-Saëns 33000 Bordeaux, France