N°d'ordre NNT :2017LYSE1104

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : Biologie
Discipline : Biologie cellulaire

Soutenue publiquement le 10/07/2017, par :

Margaux Bessou

Contribution de la forme mitochondriale de Bcl-xL dans le contrôle de la migration cellulaire

---

Devant le jury composé de :

M. Jean-Ehrland Ricci, Directeur de recherche, Inserm, Nice	Rapporteur
Mme. Muriel Priault, Chargée de recherche, HDR, CNRS, Bordeaux	Rapporteure
Mme. Urszula Hibner, Directrice de recherche, Inserm, Montpellier	Examinatrice
M. Olivier Peyruchaud, Directeur de recherche, Inserm, Lyon	Examinateur
Mme. Ruth Rimokh, Directrice de recherche, Inserm, Lyon	Directrice de thèse
M. Germain Gillet, Professeur et Praticien Hospitalier, Université Lyon1	Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Résumé en Français

Les protéines de la famille Bcl-2 sont les principaux régulateurs de la mort cellulaire par apoptose. Au sein de cette famille, la protéine Bcl-xL appartient au sous-groupe des anti-apoptotiques et contribue à maintenir la survie cellulaire. Cependant, des données récentes suggèrent que les membres de la famille Bcl-2, et en particulier Bcl-xL, ont également d'autres fonctions.

Dans le contexte pathologique du cancer du sein, la surexpression du gène *Bcl-x* n'affecterait pas la taille de la tumeur initiale mais favoriserait plutôt l'invasion ganglionnaire et la formation de métastases. La capacité des tumeurs à former des métastases repose notamment sur le potentiel migratoire et invasif des cellules cancéreuses, et de ce fait nous avons cherché à savoir si Bcl-xL pouvait contrôler ces processus. En lien avec les données cliniques, nous montrons que la perte d'expression de Bcl-xL réduit la capacité migratoire de cellules cancéreuses mammaires. De plus, le contrôle de la migration exercé par Bcl-xL est indépendant de son activité anti-apoptotique. Ainsi, l'inhibition de la poche hydrophobe de Bcl-xL par des composés BH3-mimétiques n'a pas d'effet sur la migration des cellules. Nous avons alors recherché le mécanisme par lequel Bcl-xL agit sur la migration. Nous observons que la fraction mitochondriale de Bcl-xL régule la migration cellulaire, et non la protéine localisée au réticulum endoplasmique. Au niveau de la mitochondrie, nous proposons que Bcl-xL contrôle la migration par l'intermédiaire de son domaine BH4, domaine modulant l'activité du canal mitochondrial VDAC.

Mots clés en Français

Protéines Bcl-2 – Migration – Mitochondrie – Cancer – Calcium – Bcl-xL

Résumé en Anglais

Proteins of the Bcl-2 family are the main regulators of apoptosis. Among the family, the Bcl-xL protein belongs to the anti-apoptotic subgroup and favors cell survival. However, increasing evidence suggest that Bcl-2 proteins, and in particular Bcl-xL, exert other functions in the cells.

In the pathological context of breast cancer, *Bcl-x* gene overexpression seems to have only little impact on primary tumor growth but instead increases lymph nodes invasion and metastasis. Metastasis formation mainly relies on tumor cells' ability to migrate and invade surrounding tissues. Therefore, we wondered wether Bcl-xL could control these processes.

In line with clinical data, we show that Bcl-xL complete or partial loss of expression reduces cell migration of mammary cancer cell lines. Furthermore, we find that Bcl-xL control of cell migration is independent of its anti-apoptotic activity. Indeed, treatments with BH3-mimetics that bind to and inhibit Bcl-xL hydrophobic pocket have no effect on cell migration. Since Bcl-xL regulation of cell migration seems to be independent of interactions with other Bcl-2 family members, we investigated alternative mechanisms. We observe that mitochondrial Bcl-xL, but not the ER-targeted Bcl-xL, is involved in cell migration. At the mitochondria, we propose that Bcl-xL controls cell migration through its BH4 domain, by modulating the activity of mitochondrial VDAC channel.

Mots clés en Anglais

Bcl-2 proteins – Migration – Mitochondria – Cancer – Calcium – Bcl-xL

Publications

Article 1, en préparation pour soumission au journal Scientific Reports :

Margaux Bessou, Rudy Gadet, Delphine Poncet, Adrien Nougarède, Nikolay Popgeorgiev, Jonathan Lopez, Ruth Rimokh and Germain Gillet.

The mitochondrial pool of the anti-apoptotic protein Bcl-xL controls cell migration of mammary cancer cells.

Article 2, publié en 2016 :

Lopez J. ; **Bessou M**., Riley, J.S., Giampazolias E., Todt F., Rochegüe T., Oberst A., Green D.R., Edlich F., Ichim G., Tait S.W.G.

Mito-priming as a method to engineer Bcl-2 addiction.

Nature Communications, 2016.

Adresse du laboratoire

Equipe Signalisation, Métabolisme et Progression tumorale

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

Inserm UMR 1052 – CNRS 5286

Centre Léon Bérard, bâtiment Cheney D 5e étage, 28 rue Laennec 69373 Lyon cédex 08.

Remerciements

Je n'aurais pas pu réaliser cette thèse sans l'aide des très nombreuses personnes qui m'ont aidée et entourée et que je tiens à remercier chaleureusement ici.

Je remercie en premier lieu M. ***Jean Ehrland Ricci*** *et Mme* ***Muriel Priault*** *d'avoir accepté avec beaucoup de gentillesse d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également Mme* ***Urszula Hibner*** *et M.* ***Olivier Peyruchaud*** *d'avoir accepté d'évaluer ma thèse en tant qu'examinateurs. J'adresse un grand merci à vous quatre de me faire l'honneur de juger mon travail.*

Je remercie ***Patrick Auberger*** *et* ***Servane Tauszig-Delamazure*** *pour leurs conseils avisés et leurs encouragements à l'occasion de mes comités de thèse.*

Je remercie mes directeurs de thèse ***Ruth Rimokh*** *et* ***Germain Gillet*** *pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire dès mon master 2 puis en thèse. Merci d'avoir toujours cru en ce projet même dans les moments difficiles et de m'avoir accompagnée durant ces trois années. Merci pour votre aide lors de la rédaction de l'article.*

Je remercie chaleureusement ***Jonathan Lopez*** *pour m'avoir encadrée en deuxième et troisième année de thèse, ainsi que lors de mon deuxième stage de master 2. Merci à toi de m'avoir permis de partir à l'étranger comme je le souhaitais et merci pour cette belle valorisation de notre travail qu'est l'article mito-priming. Je te remercie de m'avoir apporté de nombreux outils pour mon projet de thèse ainsi que pour ton soutien indéfectible, dans les bons comme les moins bons moments ! Merci pour tous ces moments de réflexion sur mon projet et pour la relecture attentive de ce manuscrit. Je te souhaite le meilleur pour la suite.*

Parmi l'équipe RR/GG, je remercie tout particulièrement ***Rudy Gadet*** *qui a toujours été là pour moi au laboratoire, et ce depuis le début. Merci de m'avoir patiemment appris les nombreuses techniques du labo en stage de master 2, j'espère avoir su garder ta rigueur par la suite ! Merci pour ces longues heures au confocal à se battre contre ce scélérat de calcium et merci pour tes nombreux plugin sur ImageJ qui nous ont facilité la vie à tous ! Je garderai un excellent souvenir de nos conversations animées, de tes blagues toujours de très bon goût et des moments potins, puisse-t-il y en avoir encore beaucoup !!!*

Merci ***Stéphane*** *et* ***Mathieu*** *pour votre bonne humeur constante, vos talents d'imitateurs et de mîmes, on aura passé de très bons moments grâce à vous !!! Merci* ***Mathieu*** *pour tes conseils scientifiques avisés et ton soutien, cela aura été un plaisir de faire nos thèses en même temps. Je remercie* ***Adrien*** *pour son travail sur les peptides. Merci également à* ***Léa*** *d'avoir rejoint l'équipe des thésards l'année dernière, merci pour les moments « filles » et pour avoir généreusement partagé les mérites de la cuisine libanaise !*

Merci ***Delphine*** *pour ton travail sur les bases de données qui aura apporté du poids à mes données expériementales. Merci pour ta bonne humeur et les moments tchatche ! Merci* ***Nikolay*** *pour tes nombreux conseils avisés pendant ma première année et le partage de tes expériences en montagne. Je remercie également* ***Ivan*** *et* ***Philippe*** *pour*

leurs conseils et leurs questions toujours pertinentes, merci d'avoir apporté votre regard critique sur mes résultats.

Je remercie les autres membres de l'équipe RR/GG avec qui j'ai eu la chance d'intéragir pendant trois ans : ***Virginie, Olivier M., Olivier L et Nathalie****. Merci également au* ***groupe de Philippe et Anca*** *qui nous a rejoints récemment.*

Au sein du CRCL, j'ai eu la chance de rencontrer et d'apprécier de nombreuses personnes. Parmi elles, je remercie particulièrement ***l'équipe de Muriel Le Romancer*** *avec qui nous avons souvent collaboré lorsque nous étions au quatrième étage.*

Je remercie l'équipe enseignante du département de biologie de l'ENS de Lyon pour m'avoir fait confiance lors de mon monitorat et m'avoir confié des enseignements variés et intéressants.

Pendant ces trois années, j'ai eu la chance d'être particulièrement bien entourée par mes proches, merci à vous tous d'avoir réussi à me supporter et d'être toujours aussi positifs !

Merci à mes amis de prépa ***Paul*** *et* ***Anaïs*** *pour m'avoir encouragée, merci* ***Paul*** *pour ces moments d'échange sur le monde de la recherche et pour nos séances de plaintes mutuelles ! Merci au groupe des copines de Lyon :* ***Mathilde D, Aude, Nathalie, Mathilde N****, merci pour ces tonnes de restos et soirées filles où nous avons tant partagé. Merci pour votre soutien et votre bonne humeur !!! Merci à tous les potes de l'ENS :* ***Paco, Nico, Arthur, Brice, Jean-Loup*** *et tous les autres, merci pour les soirées folles et moins folles et pour toutes les choses que nous aurons partagées au cours de ces années. Merci à tous les amis de Guilhem qui sont devenus les miens aussi, merci pour les heures de jeux de société et votre intérêt à nos thèses. Je suis sure qu'il y aura encore plein de bons moments à venir avec vous tous.*

Merci aux marseillaises, ***Fanny, Léa et Anne-Claire****, les copines, les soeurs de toujours. Je ne vous remercierai jamais assez de vos encouragements permanents et d'avoir été les oreilles attentives de tout ce que j'ai pu vivre ces trois dernières années (et de toutes les précédentes !). Merci d'être toujours là pour les bons et les mauvais moments.*

Je remercie vivement ma famille sans qui je ne serais jamais arrivée là. En particulier, merci à ***mes parents et mon frère*** *pour m'avoir aidée à vaincre mes (nombreuses) pertes de confiance en moi et pour avoir été depuis toujours mes meilleurs supporters ! Un grand merci à ma bonne maman pour tous ses bons petits plats et les nombreux moments passés ensemble. Merci à vous tous de m'avoir aidée à aller au bout de mes ambitions.*

Enfin, je te remercie ***Guilhem*** *pour avoir partagé pleinement ma vie de thésarde, avec toutes les péripéties que cela peut engendrer ! Merci pour les centaines d'heures de téléphone, les allers-retours Montereau-Lyon, ton soutien et tes encouragements permanents. Merci pour ta bonne humeur de tous les instants, je mesure tous les jours la chance que j'ai de t'avoir à mes côtés.*

Table des matières

LISTE DES FIGURES 11

LISTE DES TABLEAUX 11

LISTE DES ABREVIATIONS 12

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 14

I. LES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2, DES REGULATEURS DU DESTIN CELLULAIRE 14

A. CARACTERISTIQUES DES PROTEINES BCL-2 14
1. IDENTIFICATION DES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2 14
2. CLASSIFICATION EN TROIS SOUS-GROUPES 16
a) Les membres anti-apoptotiques 17
b) Les pro-apoptotiques multi-domaines 19
c) Le groupe des BH3-only 19
d) Les interactions protéiques au sein de la famille : bases structurales 20
3. LOCALISATION SUBCELLULAIRE ET SA DYNAMIQUE 21
a) Localisation des protéines Bcl-2 dans les cellules 21
b) Déterminants régulant la localisation cellulaire 24
c) Des fonctions différentes selon la localisation ? 26

B. ROLE DES PROTEINES BCL-2 DANS LA BALANCE SURVIE/APOPTOSE 27
1. L'APOPTOSE : IMPORTANCE PHYSIOLOGIQUE ET PRINCIPALES CARACTERISTIQUES 27
a) Les caspases, protéines effectrices de l'apoptose 27
b) Voie extrinsèque d'induction de l'apoptose 28
c) Voie mitochondriale d'induction de l'apoptose 30
2. PERMEABILISATION MITOCHONDRIALE MEDIEE PAR BAX ET BAK ET SON CONTROLE 32
a) Comment Bax et Bak perméabilisent la membrane externe mitochondriale ? 32
b) Régulation de l'activation de Bax et Bak 35
3. PERMEABILISATION MITOCHONDRIALE CALCIUM-DEPENDANTE 38

C. IMPORTANCE DES BCL-2 A L'ECHELLE DE L'ORGANISME : ETUDE DES KNOCKOUT CHEZ LA SOURIS 39
1. MEMBRES ANTI-APOPTOTIQUES 39
2. MEMBRES PRO-APOPTOTIQUES 42

II. LES FONCTIONS NON-CANONIQUES DES PROTEINES BCL-2 44

A. VERS DE NOUVELLES FONCTIONS POUR LES PROTEINES BCL-2 44
1. CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE 44
2. LES PROTEINES BCL-2 CONTROLENT LE METABOLISME GLYCOLYTIQUE ET MITOCHONDRIAL 46
3. DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE ET PROTEINES BCL-2 : DES EFFETS RECIPROQUES 48
4. LES BCL-2 DANS LA PHYSIOLOGIE NEURONALE 49
5. AUTOPHAGIE ET MITOPHAGIE 50
6. MIGRATION/INVASION (DETAILLE PARTIE III) 51

B. QUELQUES PROPRIETES DE L'HOMEOSTASIE CALCIQUE DES CELLULES NON-EXCITABLES 52
1. LE CALCIUM DANS LES CELLULES : CONCENTRATIONS ET ORGANITES DE STOCKAGE 52
2. SYSTEMES DE TRANSPORT DU CALCIUM CELLULAIRE 52
a) Transports au niveau de la membrane plasmique 52
b) Transports de calcium à travers le RE 54
c) Transport du calcium à la mitochondrie 57
d) Les MAM, zones privilégiées d'échanges de calcium entre le RE et la mitochondrie 59
C. REGULATION DE L'HOMEOSTASIE CALCIQUE PAR LES PROTEINES BCL-2 60
1. AU NIVEAU DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE 60
a) Modulation du canal IP3R 60
b) Modulation d'autres systèmes de transport réticulaires 63
2. AU NIVEAU DE LA MITOCHONDRIE 63
a) Modulation de VDAC 63
b) Modulation de NCLX 66

III. LES BCL-2 DANS LES CANCERS : ENTRE APOPTOSE ET MIGRATION 67

A. GENERALITES SUR LES CANCERS 67
1. MODELE DE LA PROGRESSION TUMORALE 67
2. MODIFICATIONS GENETIQUES ASSOCIEES AUX CANCERS 69
B. IMPLICATION DE LA FAMILLE BCL-2 DANS LES CANCERS ET TRAITEMENTS ASSOCIES 70
1. IMPLICATION DES BCL-2 DANS LES CANCERS 70
a) Altérations génétiques des Bcl-2 dans les cancers 70
b) Les gènes Bcl-2 : des marqueurs cliniques ? 71
c) Les Bcl-2 anti-apoptotiques et la résistance aux chimiothérapies 72
2. LES BH3-MIMETIQUES, DE NOUVEAUX OUTILS POUR SOIGNER CERTAINS CANCERS 72
a) Quelques exemples de BH3-mimétiques 72
b) Concept de l'addiction aux anti-apoptotiques et son application : le profilage BH3 75
c) Efficacité et résistance aux BH3-mimétiques 76
3. D'AUTRES FAÇONS DE CIBLER LES BCL-2 ANTI-APOPTOTIQUES 77
a) Peptides antagonistes ciblant l'interaction IP3R/ Bcl-2 77
b) Molécules ciblant le domaine BH4 78
4. AU-DELA DE L'APOPTOSE : ROLE DES BCL-2 DANS LA PROGRESSION TUMORALE ? 78
C. LA MIGRATION CELLULAIRE, PROPRIETE CLE DE LA PROGRESSION TUMORALE 80
1. MODES DE MIGRATION DES CELLULES CANCEREUSES 80
a) Généralités 80
b) Cas des cellules cancéreuses mammaires 81
2. PRINCIPAUX ASPECTS DE LA MIGRATION CELLULAIRE MESENCHYMATEUSE 82
a) Etapes de la propulsion cellulaire 82
b) Contrôle interne de la migration exercé par les Rho GTPases 87
c) Contrôles extracellulaires de la migration 87
3. CONTROLE DE LA MIGRATION CELLULAIRE PAR LE CALCIUM 88
a) Répartition du calcium cytosolique dans les cellules en migration 88
b) Canaux calciques et migration des cellules 89
c) Principaux effecteurs calciques impliqués dans la migration cellulaire 91

INTRODUCTION AU SUJET DE THESE 93

RÉSULTATS 95

ARTICLE N°1 95
PRÉSENTATION ARTICLE N°2 123
ARTICLE N°2 125

DISCUSSION 144

A. BCL-XL CONTROLE LA MIGRATION CELLULAIRE 144
B. INDEPENDANCE VIS-A-VIS DE L'APOPTOSE 147
C. LOCALISATION RETICULAIRE DE BCL-XL 148
D. CONTRIBUTION DU POOL MITOCHONDRIAL DE BCL-XL A LA MIGRATION CELLULAIRE 149

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 153

BIBLIOGRAPHIE 154

Liste des figures

Figure 1 : Translocation t(14,18) à l'origine de la découverte de Bcl-2 15
Figure 2: Classification des protéines Bcl-2 en trois sous-groupes 18
Figure 3: Structure de Bcl-xL lié au domaine BH3 de Bak 20
Figure 4: Domaines des caspases apoptotiques 28
Figure 5: Voie extrinsèque de l'apoptose 29
Figure 6: Voie mitochondriale de l'apoptose 31
Figure 7: Modèles de formation de pores dans la MME par Bax et Bak 34
Figure 8: Modèles antérieurs d'activation de Bax et Bak 35
Figure 9: Modes d'action des anti-apoptotiques définis par Llambi et collègues. 36
Figure 10: Sélectivité des BH3-only vis à vis des anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 37
Figure 11: Quelques effets des protéines Bcl-2 sur le cycle cellulaire 45
Figure 12: Activation du métabolisme mitochondrial par Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 47
Figure 13: Fonctionnement du SOCE 53
Figure 14: Structure et domaines du récepteur à l'IP3 56
Figure 15: Structure du canal mitochondrial VDAC 58
Figure 16: Interaction des protéines Bcl-2 anti-apoptotiques avec IP3R 62
Figure 17: Interaction de Bcl-2 et Bcl-xL avec VDAC 65
Figure 18: Vue simplifiée de la progression d'un cancer épithélial 68
Figure 19: Caractéristiques des cellules cancéreuses définies dans (Hanahan and Weinberg, 2011).. 69
Figure 20: Altérations génétiques affectant les gènes de la famille Bcl-2 dans les cancers 71
Figure 21: Comparaison de l'interaction Bcl-xL/Bad et de l'interaction Bcl-xL/ABT737 73
Figure 22: Concept du "priming" mitochondrial 76
Figure 23: Modes de migration des cellules cancéreuses 81
Figure 24: Etapes de la migration mésenchymateuse 83
Figure 25: Assemblage du réseau d'actine dans le lamellipode 84
Figure 26: Organisation moléculaire des adhésions focales 85
Figure 27: Mesure du calcium dans un fibroblaste en migration 89
Figure 28: Bilan du rôle du calcium sur une cellule en migration 92
Figure 29: Principe de la méthode "Mito-priming" 123

Liste des tableaux

Tableau 1: Localisation subcellulaire des protéines Bcl-2 22
Tableau 2: Phénotypes des souris KO pour les gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 41
Tableau 3: Phénotype des souris KO pour les gènes pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 43

Liste des abréviations

2-DG : 2-déoxy-glucose

AA : acides aminés

ADP : adénosine diphosphate

ADN : acide desoxyribo-nucléique

ANT: adenine nucleotide translocator

ARNsi: acide ribonucléique small interfering

Arp2/3: actin-related protein 2/3

ATP: adenosine triphosphate

Bad: Bcl-2-associated death promoter

Bak: Bcl-2-associated killer

Bap31: B-cell receptor-associated protein 31

Bax: Bcl-2-associated X factor

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

Bcl-xL: B-cell lymphoma extra large

Bfl-1: Bcl-2-related gene expressed in fetal liver

BH: Bcl-2 homology

BI1: Bax inhibitor 1

Bid: BH3 interacting-domain death agonist

Bik: Bcl-2-interacting killer

Bim: Bcl-2-interacting mediator of cell death

Bmf: Bcl-2 modifying factor

Bok: Bcl-2 ovarian killer

CAMKII: calmoduline kinase II

CARD: caspase activation and recruitment domain

Cdc42: cell division control protein 42

Cdk: Cyclin dependent kinase

Ced-9: cell death-abnormal 9

CICR: calcium-induced calcium release

COX: cytochrome c oxidase

Cre: causes recombination

DD: death domain

ddp: différence de potentiel

DED: death effector domain

Drp1: dynamin-related protein 1

EGF: epidermal growth factor

Src: protéine dont le nom provient de sarcome

EMT: epithelial-mesenchymal transition

FADD: Fas-associated death domain protein

FAK: focal adhesion kinase

FDA: food and drug administration

Flip: fluorescence loss in photobleaching

Frap: fluorescence recovery after photobleaching

GAP: GTPase-activating protein

GDP: guanosine diphosphate

GEF: guanine nucleotide exchange factor

GFP: green fluorescent protease

Grp75: glucose-related protein 75

GTP: guanosine triphosphate

Hrk: harakiri

IAP: inhibitor of apoptosis

IgH: immunoglobulin heavy chain

IL: interleukine

IP3: inositol 1,4,5-triphosphate

IP3R : récepteur à l'IP3

KD : knockdown

Kd : constante de dissociation

Ki: constante d'inhibition

KO: knockout

LoxP: locus of X-over P1

MAM: mitochondria-associated membranes

Mcl-1: myeloid cell leukemia 1

MCU: mitochondrial calcium uniporter

MEF: mouse embryonic fibroblast

Mfn: mitofusin

MICU1: mitochondrial calcium uptake 1

HBSS: Hank's balanced salt solution

MLCK: myosin light chain kinase

MME : membrane mitochondriale externe

MMI : membrane mitochondriale interne

MMP2 : matrix metalloproteinase 2

MOMP : mitochondrial outer membrane permeabilization

Myc : myelocytose

NCLX : Na^+ Ca^{2+} Li^+ exchanger

NCX: Na^+ Ca^{2+} exchanger

NFAT: nuclear factor of activated T cells

Noxa: NADPH oxidase activator

Orai1: calcium release-activated calcium modulator 1

ORF: open reading frame

PFK1: phospho fructo kinase 1

PIP2: phospho-inositol biphosphate

PKC: protein kinase C

PMCA: plasma membrane calcium ATPase

PTP: permeability transition pore

Puma: p53-upregulated regulator of apoptosis

Rac: ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

RE: reticulum endoplasmique

RhoA: ras homolog family member A

ROS: reactive oxygen species

RyR: ryanodin receptor

Serca: sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase

Smac: second mitochondria-derivec activator of caspases

SOCE: store-operated calcium entry

STIM: stromal interaction molecule

TAT: trans-activator of transcription

TGF beta: transforming growth factor béta

TNF: tumor necrosis factor

TRP: transient recptor potential

VDAC: voltage-dependent anion channel

vMIA: viral mitochondria-associated inhibitor of apoptosis

WAVE: nom dérivé du syndrome de Wiskott-Aldrich

z-VAD fmk : carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylcetone

Introduction bibliographique

I. Les protéines de la famille Bcl-2, des régulateurs du destin cellulaire

Les protéines de la famille Bcl-2 sont impliquées dans la régulation de l'apoptose et, *a contrario*, de la survie cellulaire. Depuis la découverte de Bcl-2 en 1985, de nombreux autres membres de la famille ont été décrits et le mode de fonctionnement de ces protéines est mieux compris. Ces dernières années, des fonctions non-apoptotiques des protéines Bcl-2 commencent à émerger.

Dans une première partie, je présente les propriétés des protéines Bcl-2 relatives à leur contrôle sur l'apoptose. Les données commentées ici seront principalement issues d'études menées chez les Mammifères.

A. Caractéristiques des protéines Bcl-2

1. Identification des membres de la famille Bcl-2

L'identification du gène *B cell lymphoma 2* (*Bcl-2*) résulte de l'étude de la translocation chromosomique se produisant entre les bras q des chromosomes 14 et 18 du génome humain, également notée t(14;18) (**Figure 1**). Cette translocation est fréquemment observée dans les cancers lymphoïdes issus de lymphocytes B. C'est donc naturellement que les efforts de recherche se sont portés vers l'étude de cette translocation, afin d'en comprendre les conséquences génétiques. A l'aide de sondes d'ADN reconnaissant la région du chromosome 18 où se produit la cassure double brin à l'origine de la translocation, l'équipe de Carlo Croce a identifié en 1985 une région d'environ 2100 paires de bases (Tsujimoto et al., 1985). Les auteurs ont désigné cette région comme étant le gène *Bcl-2*. Le fragment d'ADN encodant *Bcl-2* sera également publié quelques mois plus tard par l'équipe de Korsmeyer (Bakhshi et al., 1985).

La translocation t(14 ;18) place le gène *Bcl-2* sous le contrôle du promoteur des chaines lourdes des immunoglobulines. Ce promoteur est responsable d'une surexpression du gène *Bcl-2*, induite au niveau transcriptionnel (Tsujimoto et al., 1985).

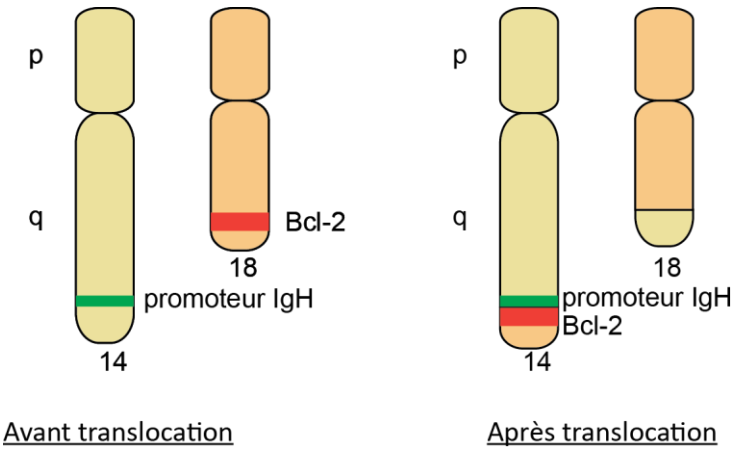


Figure 1 : Translocation t(14,18) à l'origine de la découverte de Bcl-2

L'échange des extrémités des bras q des chromosomes 14 et 18 place le gène Bcl-2 sous le promoteur des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH), induisant une surexpression de Bcl-2.

Trois ans après sa découverte, la fonction du gène *Bcl-2* est en partie élucidée. *Bcl-2* est surexprimé dans des lignées cellulaires lymphoides et myéloides dépendantes de l'interleukine 3 (IL3) pour leur survie. En absence d'IL3, les cellules meurent. Au contraire, les mêmes cellules surexprimant *Bcl-2* survivent en absence d'IL3 mais ne prolifèrent pas et restent en phase G0 du cycle cellulaire (Vaux et al., 1988). Ainsi, contrairement aux oncogènes connus jusqu'alors, *Bcl-2* n'induit pas une prolifération accrue des cellules mais bien une survie accrue.

Dans les années qui suivent, les grandes lignes du mécanisme intrinsèque de contrôle de l'apoptose sont élucidées dans le modèle invertébré *Caenorhabditis elegans*. Dans cet organisme, les études de la destinée des cellules embryonnaires révèlent qu'une centaine de cellules meurt de façon physiologique au cours du développement. Les gènes régulant la mort cellulaire programmée sont peu à peu identifiés chez C. elegans, notamment le gène *Ced-9*. Etant donné que *Bcl-2* contrôle la survie cellulaire et non la prolifération, Vaux et collègues ont émis l'hypothèse que ce gène pourrait contrôler la mort cellulaire programmée observée dans le ver. Ainsi, le gène humain *Bcl-2* est exprimé dans le ver *Caenorhabditis elegans* et il réduit le nombre de cellules embryonnaires entrant en mort cellulaire programmée (Vaux et al., 1992). Cette étude pionnière montre d'une part que *Bcl-2* contrôle la mort cellulaire programmée et, d'autre part, que les mécanismes de l'apoptose sont conservés du point de vue évolutif.

Cependant, les études ultérieures consacrées à *Bcl-2* indiquent que ce gène n'est vraisemblablement pas le seul à être impliqué dans le contrôle de la mort cellulaire. Partant de ce constat, plusieurs membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont identifiés en 1993, parmi lesquels le gène *Bcl-x*. Pour ce faire, l'équipe de Craig Thompson a utilisé des sondes d'ADN dérivées de *Bcl-2* à faible potentiel d'hybridation pour scanner le génome de cellules lymphoides du poulet (Boise et al., 1993). Ils ont ainsi identifié, chez le poulet puis chez l'Homme, une région s'hybridant partiellement à leur sonde mais distincte de la région génomique correspondant à *Bcl-2*. Le gène *Bcl-x* code en fait pour deux transcrits. Un transcrit long, nommé Bcl-xL, qui tout comme Bcl-2, est anti-apoptotique. En revanche, le second transcrit Bcl-xs encode une protéine plus courte de 63 acides aminés et promeut l'apoptose.
La même année, Bcl-2 associated X factor (Bax) est également cloné et identifié en tant que partenaire capable de se lier à Bcl-2 (Oltvai et al., 1993). De façon surprenante, ce nouveau partenaire, de séquence pourtant proche de celle de Bcl-2, induit non pas la survie mais bien la mort cellulaire. Pour la première fois, l'existence de membres pro-apoptotiques dans la famille Bcl-2 est reconnue.
Un historique plus détaillé des premiers travaux sur Bcl-2 est disponible dans la revue de John Reed (Reed, 2008).

2. Classification en trois sous-groupes

Les protéines de la famille Bcl-2 sont traditionnellement classées en trois sous-groupes qui sont définis sur des bases structurales et fonctionnelles. En termes de structure, l'alignement des séquences protéiques des Bcl-2 a permis de dégager des domaines nommés domaines Bcl-2 Homology (BH). Ces courts domaines d'une vingtaine d'acides aminés sont conservés entre les membres de la famille mais également entre les espèces. Aujourd'hui, on reconnait l'existence de quatre domaines BH. Les domaines BH1 et BH2 ont été définis dès 1994 (Yin et al., 1994). Des mutations ponctuelles dans ces domaines inhibent l'interaction entre Bcl-2 et Bax et diminuent la viabilité cellulaire, indiquant l'importance de ces domaines dans les interactions protéiques au sein de la famille. Le domaine BH3 est quant à lui le seul domaine présent dans toutes les protéines Bcl-2. Le dernier domaine, le domaine BH4, a été initialement défini comme étant présent seulement dans les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 et Bcl-w. Cependant, certains auteurs proposent une redéfinition du domaine BH4 à partir d'un alignement entre une protéine virale proche de Bcl-2 et les protéines Bcl-2 et Bcl-xL (Kvansakul et al., 2008). Cette redéfinition étend la présence du domaine BH4 à toutes les protéines Bcl-2 multi-domaines. Cela étant, les deux définitions du domaine BH4 sont encore en vigueur dans la littérature, si bien que certains auteurs décrivent un domaine BH4 dans les pro-apoptotiques multi-domaines et d'autres non.

En couplant le critère des domaines BH à celui de la fonction, on définit les trois sous-groupes de la famille Bcl-2 (Youle and Strasser, 2008). La **Figure 2** récapitule les caractéristiques des trois groupes et les membres qui s'y rapportent. Le groupe des protéines anti-apoptotiques comporte les quatre domaines BH, de même que les protéines pro-apoptotiques multi-domaines qui constituent le deuxième sous-groupe. Le dernier groupe, connu sous le nom des protéines à BH3-only, ne contient que le domaine BH3 et est pro-apoptotique.

a) Les membres anti-apoptotiques

En plus de Bcl-2, les principaux anti-apoptotiques décrits à ce jour sont Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, Bfl-1 (noté A1 chez la souris) ainsi que Nrh (également appelé Bcl-2L10 ou Bcl-B chez l'Homme et Diva Boo chez la Souris), ce dernier ayant été identifié dans notre équipe (Aouacheria et al., 2001). Tous possèdent les quatre domaines BH et exercent des fonctions anti-apoptotiques. Tous, sauf Bfl-1, présentent également un domaine transmembranaire qui leur permet de s'intégrer aux membranes intracellulaires (Mizuguchi et al., 1996; Tsujimoto et al., 1987).

De façon intéressante, au cours de l'apoptose, les fragments N-terminaux des anti-apoptotiques peuvent être clivés par des caspases (Fujita et al., 1998; Herrant et al., 2004; Michels et al., 2004). Les fragments C-terminaux résultant de ce clivage n'ont plus de domaine BH4 et sont pro-apoptotiques. Ce phénomène contribue à accélérer l'apoptose dans laquelle la cellule est engagée.

Parmi les anti-apoptotiques, la protéine Mcl-1 a une structure un peu particulière. En effet, elle possède un domaine N-terminal de 170 acides aminés en amont des domaines BH (Kozopas et al., 1993). Ce domaine comporte des séquences PEST qui permettent le recrutement de la protéine au protéasome après ubiquitination. L'ubiquitination de Mcl-1 est activée par phosphorylation, sous le contrôle de protéines telles que la GSK3 (Maurer et al., 2006). De ce fait, Mcl-1 connait un fort taux de dégradation dans les cellules et par voie de conséquences, a un taux de renouvellement élevé.

Les anti-apoptotiques se différencient également les uns des autres par leur profil d'expression dans les tissus. Nous reviendrons dessus dans la partie consacrée aux phénotypes des souris KO pour ces gènes.

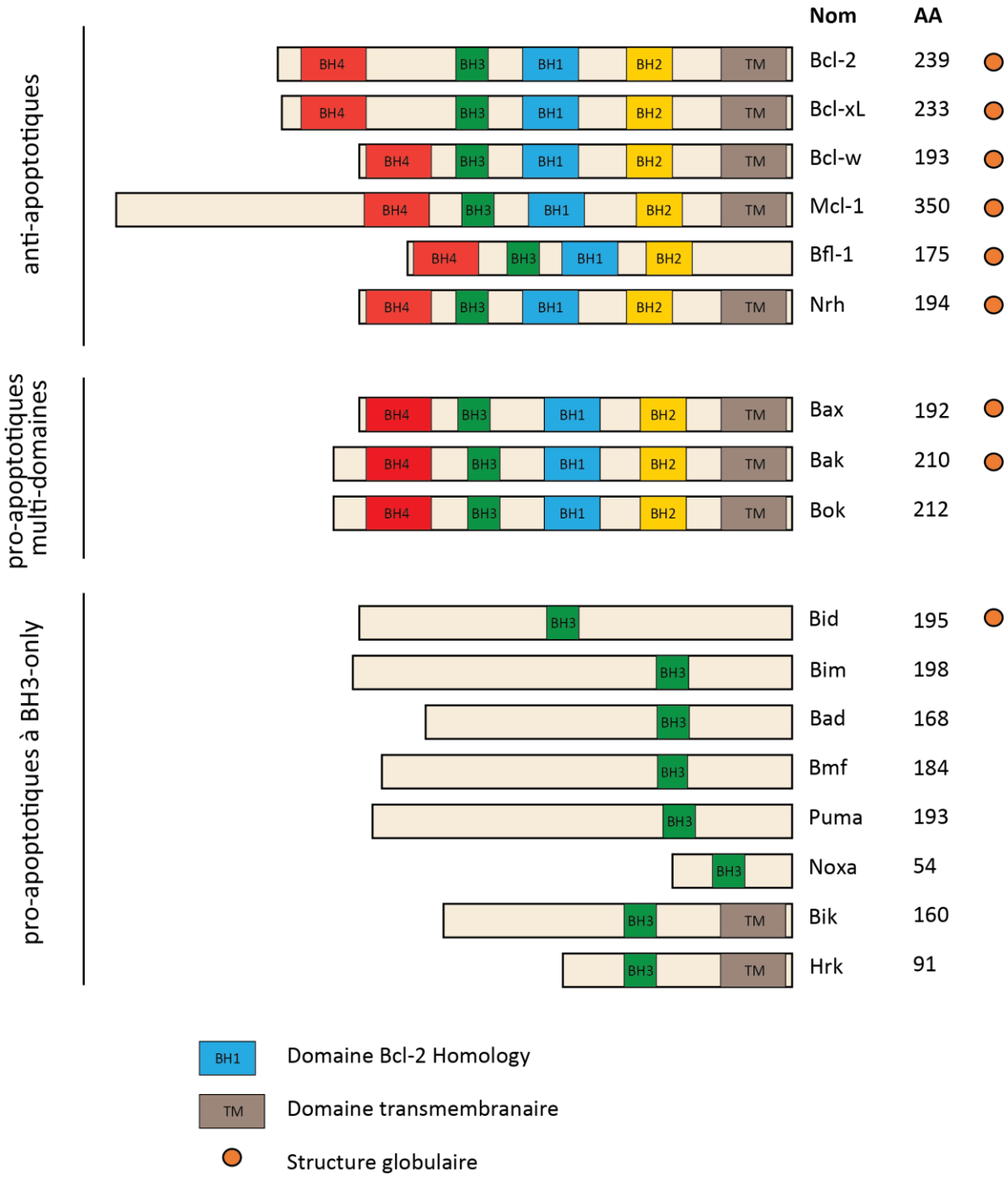


Figure 2: Classification des protéines Bcl-2 en trois sous-groupes

Le nombre de domaines BH et la fonction des protéines Bcl-2 permet de distinguer trois groupes au sein de la famille. ***AA*** *représente le nombre d'acides aminés de la protéine humaine, tel que répertorié dans la base de données Uniprot.*

b) *Les pro-apoptotiques multi-domaines*

Le sous-groupe comprend les protéines Bax et Bak ainsi que la protéine Bok. Ces protéines comportent l'ensemble des domaines BH, même si la présence du BH4 est discutée selon les auteurs. Bax et Bak provoquent la perméabilisation mitochondriale, considérée comme le point de non-retour dans l'engagement de l'apoptose. En ce qui concerne Bok, sa fonction est moins claire. Cette protéine a été découverte dans les tissus ovariens et on a longtemps pensé que son expression était restreinte aux tissus reproducteurs (Hsu et al., 1997a). Cependant, des données plus récentes indiquent que l'ARNm de Bok est détectable dans d'autres tissus, en particulier le cerveau, la rate ou le thymus des souris (Ke et al., 2012). Plusieurs études tendent à montrer que Bok exerce une fonction pro-apoptotique. En particulier, l'expression de Bok est stabilisée en présence d'inhibiteurs du protéasome et promeut alors l'apoptose de façon indépendante de Bax et Bak (Llambi et al., 2016). De plus, Bok induit la perméabilisation mitochondriale en présence de stress du RE (Carpio et al., 2015; Llambi et al., 2016). Cependant, une étude dans les tissus neuronaux réfute les résultats précédents car Bok y a un effet cytoprotecteur (D'Orsi et al., 2016). Il semble donc que soit la fonction de Bok est tissu-dépendante, soit elle est incomplètement élucidée.

c) *Le groupe des BH3-only*

Le groupe BH3-only est le plus difficile à définir car il repose sur la présence d'un seul domaine BH. Ce domaine est ainsi répertorié dans de nombreuses protéines et certains auteurs proposent de classer le domaine BH3 comme un motif de type SliM (Short Linear Motif), catégorie regroupant des motifs protéiques de quelques acides aminés comme le motif KDEL de ciblage des protéines au RE (Aouacheria et al., 2015). Actuellement, huit protéines à BH3-only sont considérées comme canoniques (Bim, Bad, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf et Bik), tandis que l'appartenance d'autres protéines à ce groupe est encore en discussion. Par exemple, la protéine Spike a été identifiée en 2003 comme protéine à BH3-only (Mund et al., 2003). Elle a une fonction pro-apoptotique mais n'interagit ni avec Bcl-2 ou Bcl-xL, ni avec Bax. De ce fait, l'importance de ce type de protéines dans la mécanistique associée à la famille Bcl-2 semble assez restreinte.

Les protéines à BH3-only sont intrinsèquement non-structurées, contrairement aux protéines multi-domaines de la famille (Kvansakul and Hinds, 2014). Seule Bid est une exception à cette règle puisqu'elle comporte 8 hélices alpha et sa structure globale a été assimilée à celle de Bcl-xL ou Bax (Chou et al., 1999; McDonnell et al., 1999).

Puma et Noxa ont la particularité d'être les cibles transcriptionnelles de p53 (Nakano and Vousden, 2001; Oda et al., 2000).

Les protéines à BH3-only se distinguent les unes des autres par leur profil d'expression et leur sélectivité vis-à-vis des autres protéines de la famille.

Les protéines des différents sous-groupes sont capables d'interagir entre elles. Les interactions reposent sur des bases structurales qui ont peu à peu été élucidées notamment grâce aux techniques de cristallisation de protéines.

d) Les interactions protéiques au sein de la famille : bases structurales

Bien que découverte plus tardivement, Bcl-xL est la première protéine Bcl-2 dont la structure a été résolue par cristallographie aux rayons X (Muchmore et al., 1996). La protéine présente 7 hélices alpha et ses domaines BH1, BH2 et BH3 forment une poche hydrophobe, capable de lier le domaine BH3 des pro-apoptotiques, comme en témoigne la cristallisation du complexe Bak/ Bcl-xL publiée un an plus tard (Sattler et al., 1997, **Figure 3**). Tout comme Bcl-xL, les autres protéines anti-apoptotiques comportent une poche hydrophobe au sein de laquelle le domaine BH3 des pro-apoptotiques (multi-domaines ou BH3-only) peut s'insérer.

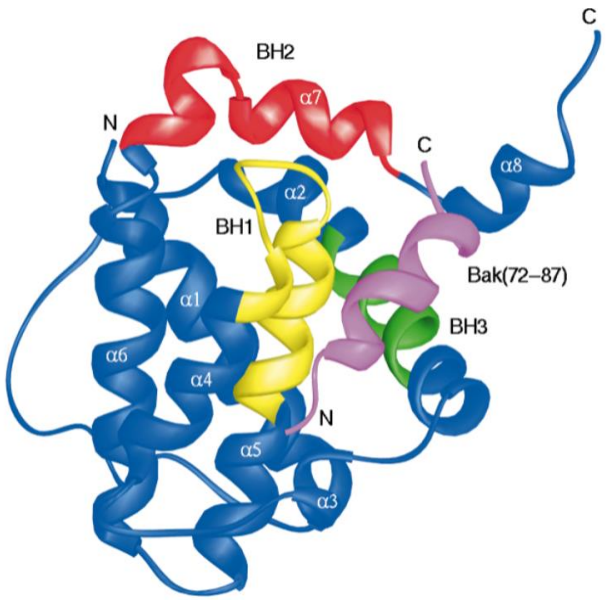


Figure 3: Structure de Bcl-xL lié au domaine BH3 de Bak

Bcl-xL (en bleu, rouge, vert et jaune) tronqué de ses AA 45 à 84 (région correspondant à une boucle flexible) a été cristallisé en présence d'un peptide issu de Bak (en rose). Les domaines BH1 (jaune), BH2 (rouge) et BH3 (vert) de Bcl-xL forment une poche hydrophobe au sein de laquelle le peptide Bak (rose) s'insère. Le complexe est stabilisé par des interactions hydrophobes entre résidus de charges opposées. D'après (Sattler et al., 1997).

Les études structurales puis fonctionnelles ont permis de mieux comprendre les interactions qui s'exercent entre les différents membres de la famille. De plus, les données structurales ont également pointé la ressemblance entre la structure 3D des protéines Bcl-2 multi-domaines et celle des protéines bactériennes capables de former des pores (Sattler et al., 1997). Cette observation se révèlera particulièrement importante, notamment pour expliquer le rôle des protéines Bax et Bak dans la perméabilisation mitochondriale, comme nous le verrons par la suite.

3. Localisation subcellulaire et sa dynamique

a) Localisation des protéines Bcl-2 dans les cellules

Membres anti-apoptotiques

Les protéines Bcl-2 multi-domaines présentent un domaine transmembranaire et sont donc capables de s'intégrer dans les membranes cellulaires (**Tableau 1**). Très rapidement après sa découverte, Bcl-2 a été détectée dans la membrane mitochondriale externe par immunofluorescence et sa localisation mitochondriale a été immédiatement reliée à son rôle anti-apoptotique (Hockenbery et al., 1990). Cependant, Bcl-2 est également présente dans d'autres compartiments tels que l'enveloppe nucléaire ou le réticulum endoplasmique (Akao et al., 1994; Krajewski et al., 1993). Certaines études indiquent la présence de Bcl-2 à la membrane mitochondriale interne, possiblement en interaction avec l'ATP synthase F0F1 (Gotow et al., 2000). Nrh, tout comme Bcl-2, se retrouve à la mitochondrie, au RE et dans le noyau (Bonneau et al., 2016; Guérin et al., 2013).

En ce qui concerne Bcl-xL, la protéine est présente dans toutes les fractions obtenues par fractionnement subcellulaire : cytosol, mitochondrie, RE, noyau (Mizuguchi et al., 1996). La fraction mitochondriale semble la plus abondante dans les cellules, même si les autres fractions ne sont pas négligeables. Comme pour Bcl-2, Bcl-xL a été visualisé à la membrane mitochondriale interne dans les neurones (Alavian et al., 2011; Chen et al., 2011). Mcl-1 est détecté dans les mêmes compartiments que Bcl-xL (Germain and Shore, 2003).

Bcl-w est présent majoritairement à la mitochondrie, comme le révèlent des expériences d'immunofluorescence, mais on retrouve cette protéine également dans le cytosol et le noyau (O'Reilly et al., 2001). La protéine Bfl-1 est, elle aussi, majoritairement mitochondriale (Brien et al., 2009). Une étude montre de plus qu'un variant transcriptionnel de Bfl-1 est nucléaire (Ko et al., 2003).

Sous-groupe	Nom de la protéine	Localisations subcellulaires	Références
Anti-apoptotiques	**Bcl-2**	MME, MMI, RE, noyau	(Akao et al., 1994; Gotow et al., 2000; Hockenbery et al., 1990; Krajewski et al., 1993)
	Bcl-xL	MME, MMI, RE, cytosol, noyau	(Alavian et al., 2011; Chen et al., 2011; Mizuguchi et al., 1996; Williams et al., 2016)
	Mcl-1	MME, MMI, RE, cytosol, noyau	(Germain and Shore, 2003)
	Bcl-w	MME, cytosol, noyau	(O'Reilly et al., 2001)
	Bfl-1	MME, noyau	(Brien et al., 2009; Ko et al., 2003)
	Nrh	MME, RE, noyau	(Bonneau et al., 2016; Guérin et al., 2013)
Pro-apoptotiques multi-domaines	**Bax**	Cytosol, MME, RE, noyau, lysosomes	(Edlich et al., 2011; Guan et al., 2015; Joy et al., 2000; Scorrano et al., 2003)
	Bak	MME, RE, péroxysomes	(Hosoi et al., 2017; Klee et al., 2009)
	Bok	RE, appareil de Golgi	(Echeverry et al., 2013)
Pro-apoptotiques à BH3-only	**Bim**	Cytosol, MME, RE	(Morishima et al., 2004; Puthalakath et al., 1999; Zhu et al., 2004)
	Bmf	Cytosol	(Puthalakath et al., 2001)
	Bid	Cytosol, MME	(Gross et al., 1999)
	Bad	Cytosol, MME	(Zha et al., 1996)
	Puma	MME	(Nakano and Vousden, 2001)
	Noxa	MME	(Oda et al., 2000)
	Bik	MME, RE	(Germain et al., 2005; Mathai et al., 2002)
	Hrk	MME, RE	(Inohara et al., 1997)

Tableau 1: Localisation subcellulaire des protéines Bcl-2

Abréviations utilisées : MME (membrane mitochondriale externe), MMI (membrane mitochondriale interne), RE (réticulum endoplasmique).

Pro-apoptotiques multi-domaines

Longtemps considérée comme exclusivement mitochondriale, la protéine Bak est aussi en partie située au RE (Klee et al., 2009). Dans une étude récente, Bak est détectée aux peroxysomes dans des cellules déficientes pour VDAC2 (Hosoi et al., 2017). Bak induit le relargage de la catalase des péroxysomes vers le cytosol, ce qui suggère que Bak peut perméabiliser les péroxysomes.

Bax, quant à elle, est localisée dans de nombreux compartiments cellulaires : essentiellement cytosolique dans les cellules saines et mitochondriale dans les cellules en apoptose, on la retrouve aussi au noyau (Joy et al., 2000) et au RE (Scorrano et al., 2003). La localisation subcellulaire de Bax est particulièrement dynamique, aussi bien dans les cellules saines que dans les cellules en apoptose.

La dynamique de Bax dans les cellules saines a été explorée dans un article publié en 2011. Edlich et collègues y synthétisent une protéine Bax dont la conformation est modifiée par rapport à la protéine sauvage, en induisant la formation de ponts disulfure exogènes (Edlich et al., 2011). Ce mutant de Bax est noté Bax 1-2/L6. De façon intéressante, alors que Bax WT est cytoplasmique, Bax 1-2/L6 est mitochondriale. De plus, le mutant est incapable de se lier à Bcl-xL. La dynamique cellulaire des protéines Bax sauvages et mutantes fusionnées à une GFP est mesurée par des expériences de FLIP (Fluorescence loss in photobleaching) et de FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching). Ces expériences indiquent que Bax sauvage est ciblé à la mitochondrie mais est constamment ramené dans le cytoplasme par Bcl-xL. Au contraire, le mutant Bax 1-2/L6 est en permanence mitochondrial car incapable de lier Bcl-xL. Le phénomène décrit ici est le phénomène de rétro-translocation de Bax, depuis la mitochondrie vers le cytosol. Il est contrôlé par Bcl-xL et empêche Bax d'exercer une activité pro-apoptotique. Ces observations confirment les résultats obtenus dans d'autres systèmes où la double expression de Bax et Bcl-xL change la localisation subcellulaire de Bax. Alors que Bax seul est largement mitochondrial, Bax en présence de Bcl-xL devient plutôt cytosolique (Priault et al., 1999).

Un an plus tard, l'équipe d'Edlich découvre que le domaine C-terminal de Bcl-xL est nécessaire pour rétro-transloquer Bax dans les cellules saines (Todt et al., 2013). Un autre partenaire de Bax à la mitochondrie a plus récemment été identifié comme élément essentiel pour la rétro-translocation de Bax : la porine VDAC2. En effet, Bax et VDAC2 forment un complexe à la mitochondrie au niveau duquel Bax est rétro-transloquée (Lauterwasser et al., 2016).

Par ailleurs, il semble que tout comme Bax, Bak serait aussi en permanence rétro-transloquée de la mitochondrie vers le cytosol dans les cellules saines, mais à un taux beaucoup plus faible que pour Bax. Par conséquent, en immunofluorescence sur cellules fixées, Bax apparait cytoplasmique alors que Bak est mitochondriale (Todt et al., 2015). De plus, le taux de rétrotranslocation dépend du domaine d'ancrage à la membrane de Bax et Bak. Ainsi, une protéine chimère Bax dont le domaine d'ancrage a été remplacé par celui de Bak a le même taux de rétrotranslocation que la protéine Bak sauvage.

Dans les cellules apoptotiques, Bax, auparavant cytosolique, devient mitochondriale et exerce son activité pro-apoptotique au niveau de ce compartiment (Hsu et al., 1997). Suite à un stress apoptotique, Bax peut aussi passer du cytosol vers le noyau (Mandal et al., 1998) ou vers les lysosomes (Guan et al., 2015).

La localisation subcellulaire de Bok est moins claire, même si la protéine semble majoritairement observée au RE et à l'appareil de Golgi (Echeverry et al., 2013).

Protéines BH3-only

Les protéines BH3-only résident dans différents compartiments (**Tableau 1**). Là encore, il existe une dynamique de localisation entre cellules saines et cellules en apoptose.

Bid et Bad sont cytosoliques mais s'insèrent dans la membrane mitochondriale externe au moment de l'apoptose (Gross et al., 1999; Zha et al., 1996).

Bim L et Bmf sont présentes dans le cytosol où elles interagissent avec des composants du cytosquelette, respectivement dynéine et microtubules pour Bim, myosine Va et actine pour Bmf (Puthalakath et al., 1999, 2001). Bim peut également lier les anti-apoptotiques au niveau de la mitochondrie (Zhu et al., 2004) et certaines études détectent Bim au RE où elle régulerait l'apoptose en réponse à un stress réticulaire (Morishima et al., 2004).

Puma et Noxa sont des protéines mitochondriales (Nakano and Vousden, 2001; Oda et al., 2000).

Enfin, Hrk et Bik possèdent un domaine transmembranaire, on les retrouve à la mitochondrie et au RE (Inohara et al., 1997; Mathai et al., 2002). Bik au RE favoriserait les transferts de calcium du RE vers la mitochondrie, ce qui activerait Drp1, protéine capable de mobiliser le cytochrome c à partir des cristae mitochondriaux où le cytochrome c est emprisonné (Germain et al., 2005).

b) Déterminants régulant la localisation cellulaire

Comment sont ciblées les protéines Bcl-2 vers un compartiment plutôt qu'un autre ? Des signaux au sein des protéines elles-mêmes ont été identifiés. En ce qui concerne Bcl-2, son domaine C-terminal régule sa localisation mitochondriale : un mutant de Bcl-2 ayant perdu ses 22 derniers acides aminés ne se retrouve plus à la membrane mitochondriale externe (Nguyen et al., 1993). La localisation de Bcl-2 au RE ne semble par contre pas être contrôlée par le domaine C-terminal dans cette étude. D'autres travaux comparant Bcl-2 et Bcl-xL montrent que le domaine transmembranaire C-terminal de ces protéines est nécessaire à leur localisation mitochondriale mais n'est pas pour autant suffisant. Kaufmann et al mettent ainsi en évidence l'importance de deux résidus de Bcl-xL situés en amont de son domaine transmembranaire qui cibleraient Bcl-xL spécifiquement à la mitochondrie, alors que les

deux résidus correspondants de Bcl-2 sont différents et induisent la localisation de Bcl-2 également au RE (Kaufmann et al., 2003). Ces résultats soulignent qu'une variation de quelques résidus seulement peut expliquer des différences de localisation entre les protéines Bcl-2.

De façon similaire à Bcl-2 et Bcl-xL, le domaine C-terminal des BH3-only est important pour leur localisation, bien qu'il ne s'agisse pas toujours d'un domaine transmembranaire canonique. Dans une étude d'Andreu-Fernandez et collègues, les domaines C-terminaux des BH3-only ont été fusionnés à une GFP. Les domaines C-terminaux de Bim et Puma ciblent la GFP majoritairement à la mitochondrie et minoritairement au RE, tandis que celui de Bik cible au RE. Le domaine C-terminal de Noxa ne cible pas les membranes intracellulaires, tandis que pour Bmf, les résultats *in vitro* et *in cellulo* ne concordent pas (Andreu-Fernández et al., 2016). Ces résultats soulignent là encore l'importance du domaine C-terminal pour la localisation des protéines Bcl-2. D'autre part, les spécificités de chaque domaine ciblent les BH3-only à des compartiments cellulaires différents.

Le domaine C-terminal n'est pas le seul à contrôler la localisation des protéines Bcl-2. Par exemple, le domaine N-terminal de Mcl-1 contribue de façon importante à réguler sa localisation mitochondriale et nucléaire, en plus du domaine C-terminal. De fait, la délétion du domaine N-terminal rend Mcl-1 majoritairement cytoplasmique et non plus mitochondriale (Germain and Duronio, 2007). Par ailleurs, le domaine fait l'objet de modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations et certaines de ces modifications pourraient réguler la localisation de Mcl-1.

Contrairement aux autres protéines Bcl-2 multi-domaines, le domaine C-terminal de Bax ne semble pas être déterminant pour cibler Bax à la mitochondrie. En effet, en conditions non-apoptotiques, Bax est très peu présent à la mitochondrie et il en est de même pour Bax dépourvu de domaine C-terminal. De façon intéressante, une construction chimère de Bcl-xL où le domaine C-terminal de Bcl-xL est remplacé par celui de Bax perd en partie sa capacité à se lier à la mitochondrie, indiquant que le domaine C-terminal de Bax n'est pas crucial pour le ciblage de la protéine à la mitochondrie (Tremblais et al., 1999). En revanche, le domaine N-terminal de Bax, et plus précisément les acides aminés 20 à 37 semble être un déterminant majeur de la localisation de Bax, puisque Bax tronqué en N-terminal perd cette fois totalement sa capacité à lier les mitochondries (Cartron et al., 2003). Ces résultats sont contrebalancés par une autre approche expérimentale consistant à fusionner une protéine fluorescente en amont ou en aval de Bax. Lorsqu'une GFP est fusionnée en aval de Bax, Bax perd sa localisation mitochondriale, ce qui n'est pas le cas lorsqu'une YFP est fusionnée en amont de Bax. Ainsi, le domaine C-terminal de Bax serait essentiel à la localisation mitochondriale de la protéine (Valentijn et al., 2008). Quoi qu'il en soit, le domaine C-terminal de Bax reste à part par rapport à ceux des autres Bcl-2 multi-domaines car il ne cible pas Bax constitutivement à une membrane intracellulaire.

Les modifications post-traductionnelles peuvent également être déterminantes pour la localisation des protéines Bcl-2. C'est le cas pour Bcl-2 et Bcl-xL : la phosphorylation de ces protéines impacte leur localisation nucléaire (Barboule et al., 2005; Wang et al., 2014).

Un dernier déterminant est le partenaire avec lequel les protéines interagissent. Par exemple Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL et Nrh interagissent toutes avec le récepteur à l'IP3 du RE, ce qui rapproche inévitablement ces anti-apoptotiques du RE (voir partie consacrée à la régulation de l'homéostasie calcique). Autre exemple, concernant un membre pro-apoptotique cette fois, la localisation cytosolique de Bax dans les cellules saines est constamment régulée par Bcl-xL, qui provoque la rétrotranslocation de Bax de la mitochondrie vers le cytosol.

c) Des fonctions différentes selon la localisation ?

Lorsqu'une protéine est présente dans plusieurs compartiments cellulaires, il est possible qu'elle exerce des rôles différents selon le compartiment, notamment parce qu'elle n'interagira pas avec les mêmes partenaires. Cette question est en partie explorée par Eno et al qui utilisent un modèle de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) knock-out (KO) pour Bcl-xL. Les MEFs sont ensuite complémentées par Bcl-xL ciblé exclusivement à la mitochondrie ou au RE. Bcl-xL mitochondrial restaure à lui seul la fonction anti-apoptotique de Bcl-xL. Bcl-xl réticulaire quant à lui n'a pas d'effet sur la mort cellulaire, en revanche il régule l'homéostasie calcique du RE (Eno et al., 2012). Un autre groupe avait précédemment montré que Bcl-2 exprimé de façon transitoire à la mitochondrie ou au RE n'avait pas les mêmes effets sur la cellule. Dans ce contexte, Bcl-2 au RE exerce un rôle prépondérant pour assurer la survie cellulaire (Wang et al., 2001).
Ces deux études posent les jalons d'un concept selon lequel les protéines Bcl-2 pourraient assumer différentes activités selon leur localisation.

B. Rôle des protéines Bcl-2 dans la balance survie/apoptose

1. L'apoptose : importance physiologique et principales caractéristiques

L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée qui régule un certain nombre de processus physiologiques. Au cours du développement embryonnaire, la forme des organes ou le nombre de cellules tissulaires sont contrôlés par apoptose. A titre d'exemple, on peut citer l'individualisation des doigts qui se produit par apoptose des cellules interdigitales ; ou la formation du cerveau où l'on estime que près de la moitié des neurones en développement sont éliminés par apoptose (Fuchs and Steller, 2011). Lors de la vie adulte, l'apoptose contrôle l'homéostasie tissulaire. Elle permet ainsi d'éliminer les cellules défectueuses ou endommagées, de renouveler les tissus (par exemple, le renouvellement des cellules épithéliales de l'intestin fait intervenir de l'apoptose (Edelblum et al., 2006)) et de contrôler le nombre de cellules immunitaires, notamment les lymphocytes (Opferman, 2008). Des défauts de la machinerie apoptotique ou de sa régulation peuvent entrainer des maladies. Ainsi, le déficit d'apoptose est une des caractéristiques des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011).

L'engagement dans l'apoptose se déroule en plusieurs étapes successives. Les cellules reçoivent des signaux apoptotiques provenant l'intra- ou de l'extra-cellulaire. Ces signaux sont intégrés par les facteurs contrôlant l'apoptose/la survie cellulaire. Si les signaux font pencher la balance en faveur de l'apoptose, celle-ci se déclenche. Les caspases sont alors activées et provoquent une cascade protéolytique conduisant à la mort de la cellule.

a) Les caspases, protéines effectrices de l'apoptose

L'engagement cellulaire dans l'apoptose est marqué par l'activation des caspases. Il s'agit d'endo-protéases capables de cliver des protéines cibles au niveau de résidus aspartates, grâce à un résidu cystéine présent dans le site actif des caspases (d'où leur nom : « casp » pour cystéine-aspartate). Les caspases sont présentes en permanence dans les cellules sous forme de pro-caspases inactives qui pourront être activées par clivage ou par dimérisation (Li and Yuan, 2008).

Les caspases impliquées dans l'apoptose se divisent en deux catégories : les caspases 2, 8, 9, 10 sont des caspases initiatrices, tandis que les caspases 3, 6 et 7 sont des caspases effectrices (**Figure 4**). Les caspases initiatrices sont recrutées et activées par les voies de régulation de l'apoptose. Ces caspases possèdent des domaines particuliers permettant leur recrutement : les caspases 8 et 10 possèdent un domaine DED (Death Effector Domain) tandis que les caspases 2 et 9 comportent un domaine CARD

(CAspase Recruitment Domain). Une fois recrutées, les caspases initiatrices s'activent par dimérisation et clivent les caspases effectrices, qui elles peuvent initier la cascade protéolytique apoptotique. Les caspases effectrices sont activées par clivage et clivent à leur tour de très nombreux substrats cellulaires. Au moins 400 substrats ont été identifiés à ce jour (Lüthi and Martin, 2007).

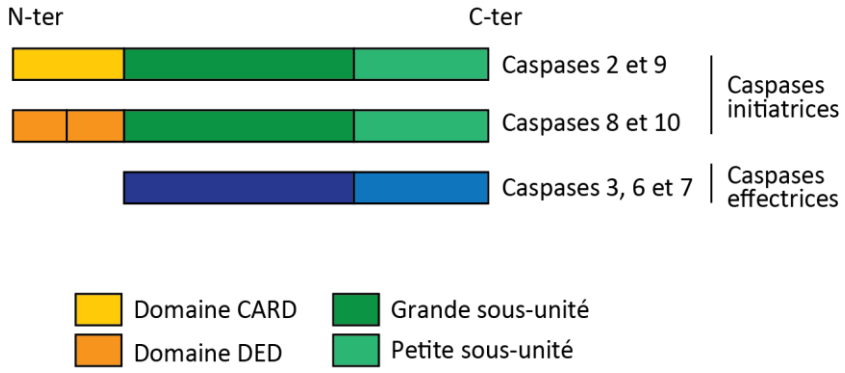


Figure 4: Domaines des caspases apoptotiques

Les caspases sont subdivisées en deux groupes, selon la présence ou non de domaines de recrutement (CARD et DED). Les protéines peuvent êtres clivées au niveau de la jonction entre petite sous-unité et grande sous-unité.

Deux voies de signalisation peuvent conduire la cellule à entrer en apoptose : la voie extrinsèque ou la voie intrinsèque.

b) Voie extrinsèque d'induction de l'apoptose

Cette voie est principalement déclenchée au cours du développement embryonnaire ou au moment de la reconnaissance de cellules anormales par le système immunitaire. La voie est dite extrinsèque car la cellule répond à des stimuli extracellulaires.

Ces stimuli sont les ligands de récepteurs transmembranaires appelés récepteurs de mort, parmi lesquels on peut citer les récepteurs de la famille Fas et TRAIL. Les récepteurs comportent au niveau cytoplasmique un domaine DD (Death Domain). En présence de leurs ligands, les récepteurs forment des trimères par liaison des domaines DD entre eux. L'oligomérisation du récepteur induit le recrutement de protéines adaptatrices qui se lient au domaine DD du récepteur via leur propre domaine DD. Parmi ces protéines adaptatrices, la protéine FADD a été découverte grâce à un crible en double hybride chez la levure et caractérisée pour sa capacité à induire l'apoptose (Chinnaiyan et al.,

1995). FADD recrute la caspase initiatrice 8 via son domaine DED (Juo et al., 1998). L'ensemble de récepteurs oligomérisés et des protéines liées au DD est aussi appelé DISC (Death Inducing Signaling Complexes). La caspase 8 au sein du DISC est activée. La caspase 8 activée peut directement cliver et activer à leur tour les caspases effectrices 3 et 7 (**Figure 5**). Dans d'autres cas, la caspase 8 clive la protéine à BH3-only Bid (Luo et al., 1998). Ce clivage génère deux fragments de Bid. Le fragment C-terminal noté tBid est pro-apoptotique et est localisé à la mitochondrie, alors que la protéine initiale Bid est cytosolique. tBid inhibe Bcl-xL par interaction directe et est également capable d'induire la perméabilisation mitochondriale (Li et al., 1998). tBid est en fait un régulateur de la seconde voie d'induction de l'apoptose, la voie dite intrinsèque. L'activation de Bid par la caspase 8 en réponse aux effecteurs de mort extracellulaires constitue un croisement entre les deux principales voies de régulation de l'apoptose.

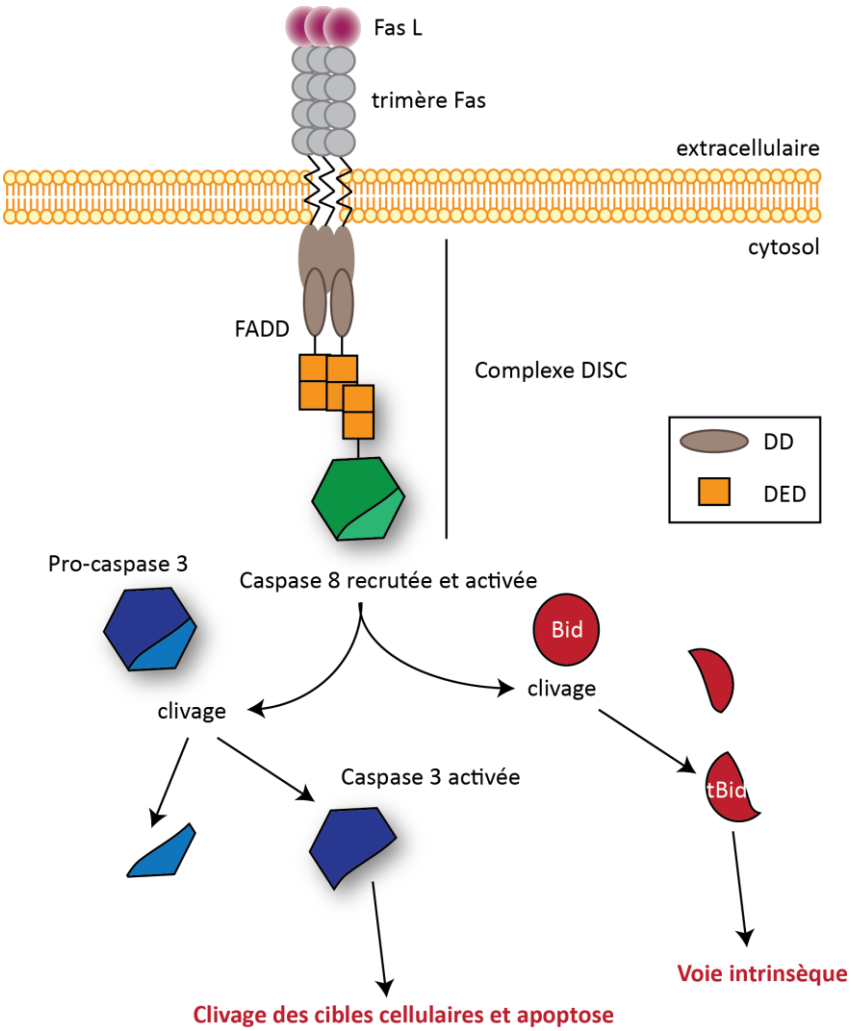


Figure 5: Voie extrinsèque de l'apoptose

La liaison de FasL à son récepteur Fas conduit à la formation d'un trimère de récepteur transmembranaire. Au niveau cytoplasmique, FADD est recrutée par son domaine DD et recrute à son tour la caspase 8. Au sein du DISC ainsi formé, la caspase 8 est activée et clive ses cibles : les caspases effectrices comme la caspase 3 et la protéine à BH3-only Bid.

c) *Voie mitochondriale d'induction de l'apoptose*

La voie mitochondriale ou intrinsèque est généralement déclenchée par des stress cellulaires internes : dommages génomiques importants, déficits en oxygène ou nutriments… Cette voie conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MME). Les facteurs présents dans l'espace intermembranaire sont relâchés dans le cytosol (Tait and Green, 2013).

Le cytochrome c et la formation de l'apoptosome

Le cytochrome c, présent dans l'espace intermembranaire mitochondrial lorsque la cellule est saine, envahit le cytosol à la suite de la perméabilisation mitochondriale. Dans ce compartiment, le cytochrome c s'assemble avec la protéine Apaf1 en un complexe multiprotéique qui a la forme d'une roue à 7 bras (Acehan et al., 2002). Chaque bras est formé d'une protéine Apaf1 et lie une molécule de cytochrome c à son extrémité. Le complexe recrute la pro-caspase 9, formant ainsi l'apoptosome (**Figure 6**). A cause de sa structure, l'apoptosome est souvent surnommé « roue de la mort ». Les techniques de microscopie électronique modernes permettent de résoudre la structure de ce complexe protéique à l'échelle de l'Angström et montrent que la formation de l'apoptosome requiert des changements de conformation importants pour les protomères d'Apaf1 (Zhou et al., 2015). Apaf1 comporte un domaine CARD auquel se lie la pro-caspase 9, également détentrice d'un domaine CARD (Li et al., 1997). Des données récentes modifient la stœchiométrie du complexe apoptosome/caspase9 : on pensait auparavant qu'un protomère Apaf1 recrutait une molécule de caspase 9. Il semblerait qu'en fait l'activation de la caspase 9 requiert la liaison avec deux protomères Apaf1, ce qui donne un ratio de quatre caspases 9 activées par apoptosome (Hu et al., 2014). Si Apaf1 exerce un rôle clé dans le recrutement de la caspase 9, l'importance du cytochrome c dans le déclenchement de l'apoptose n'est pas à négliger pour autant puisque les cellules déficientes en cytochrome c sont incapables d'entrer en apoptose (Matapurkar and Lazebnik, 2006). Une fois recrutée par l'apoptosome, la caspase 9 se dimérise et active les caspases effectrices telles que les caspases 3 ou 7.

Smac et Omi, des inhibiteurs des IAP

La protéine Smac (ou Diablo) et la protéine Omi (ou HtrA2) sont présentes dans l'espace intermembranaire mitochondrial des cellules saines. Omi y exerce une fonction de protéine chaperon alors que la fonction de Smac n'est pas encore élucidée. Les deux protéines sont relâchées dans le cytosol suite à la perméabilisation de la MME et inhibent les protéines de la famille IAP, qui sont eux-mêmes des inhibiteurs de l'apoptose (Suzuki et al., 2001; Verhagen et al., 2000).

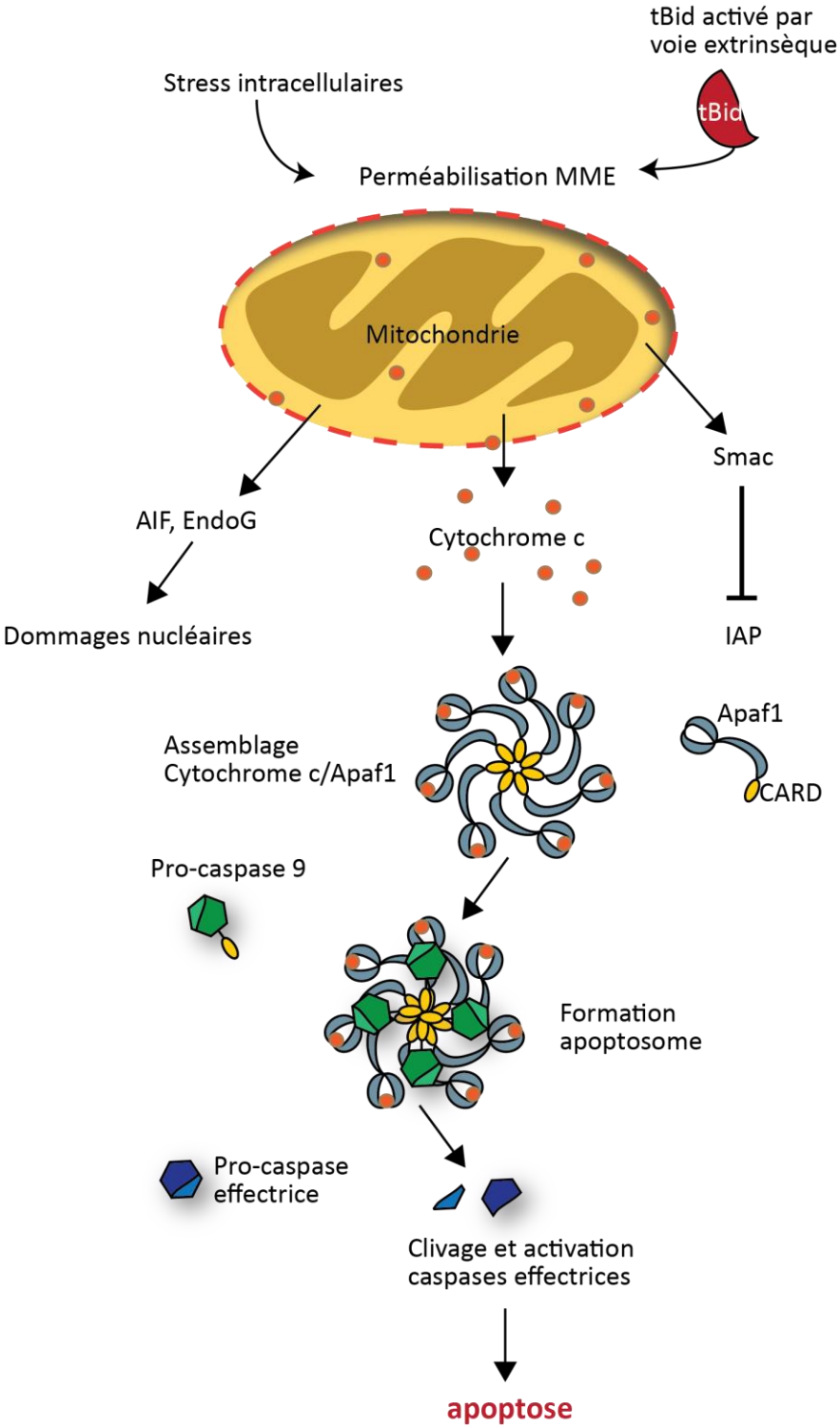


Figure 6: Voie mitochondriale de l'apoptose

La perméabilisation de la MME est enclenchée par des stress intracellulaires ou par la voie extrinsèque via Bid. Il en résulte la sortie de facteurs de l'espace intermembranaire. Parmi eux, le cytochrome c s'assemble avec Apaf1. Ensemble, ils recrutent la pro-caspase 9 au sein d'un complexe multiprotéique, l'apoptosome. Les caspases effectrices sont activées par l'apoptosome et la cellule entre en apoptose.

AIF et EndoG provoquent des dommages nucléaires

La protéine AIF (Apoptosis Inducing Factor) est mitochondriale mais entre dans le noyau après perméabilisation mitochondriale. Au noyau, cette protéine engendre condensation et fragmentation de la chromatine (Susin et al., 1999). L'Endonucléase G (EndoG) agit de façon similaire (Li et al., 2001).

L'entrée dans le cytosol de ces protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial active les effecteurs de l'apoptose, inhibe des facteurs de survie et contribue à la dégradation du matériel génétique. La perméabilisation mitochondriale à l'origine de tous ces phénomènes est générée soit directement par les protéines Bcl-2, soit par une surcharge de calcium.

2. Perméabilisation mitochondriale médiée par Bax et Bak et son contrôle

Les protéines pro-apoptotiques multi-domaines Bax et Bak sont nécessaires pour perméabiliser la membrane mitochondriale externe : les fibroblastes de souris double déficients pour Bax et Bak sont résistants aux stress induisant l'apoptose (actinomycine D, etoposide, UV, thapsigargine) (Wei et al., 2001). Cependant, le mécanisme exact par lequel ces deux protéines induisent la perméabilisation membranaire reste incomplètement déterminé, bien que plusieurs possibilités soient débattues.

a) Comment Bax et Bak perméabilisent la membrane externe mitochondriale ?

Sous l'effet de facteurs activateurs tels que les protéines à BH3-only, Bax et Bak changent de conformation et s'homo-oligomérisent (Westphal et al., 2011). Cette oligomérisation est essentielle pour l'induction de la perméabilisation de la MME (Dewson et al., 2008; George et al., 2007). Le mécanisme d'oligomérisation semble similaire entre les deux protéines car il repose sur des interactions entre le domaine BH3 d'un protomère et la poche hydrophobe (principalement le domaine BH1) d'un second protomère. Bak forme d'abord un dimère avant de donner des oligomères de plus grande taille (Brouwer et al., 2014; Dewson et al., 2008). Pour Bax, des modèles plus complexes d'oligomérisation étaient en vigueur jusqu'à ce que des données récentes indiquent que Bax formerait lui aussi d'abord des dimères avant de constituer des multimères plus importants (Czabotar et al., 2013; Subburaj et al., 2015). Au cours des trois dernières années, de nombreuses publications notamment basées sur des structures cristallisées de Bax et Bak ont permis d'affiner encore les mécanismes moléculaires d'oligomérisation de Bax et Bak. Ces données sont détaillées dans la revue de Garcia-Saez (Cosentino and García-Sáez, 2016).

Si l'oligomérisation de Bax et Bak et son importance pour la perméabilisation membranaire sont communément admises, la question reste (partiellement) ouverte de savoir si les oligomères forment eux-mêmes des pores, contribuent à la formation de pores lipidiques ou induisent l'ouverture d'un pore protéique : le pore de transition de perméabilité (PTP) (Bender and Martinou, 2013).

Induction de l'ouverture du PTP

Cette hypothèse repose sur l'existence du PTP, pore multiprotéique dont la composition moléculaire est débattue, et son ouverture activée par Bax et Bak. Il s'agit d'une des premières hypothèses émises pour expliquer le mode d'action de Bax et Bak mais qui semble aujourd'hui mise à mal par l'ensemble de la communauté. En effet, l'étude des MEFs des souris KO pour la Cyclophiline D, un régulateur majeur du PTP, montre que celles-ci sont sensibles aux stimuli pro-apoptotiques classiques tels que l'étoposide, la staurosporine ou le traitement combiné TNFalpha/cycloheximide (Nakagawa et al., 2005). En revanche, les MEFs sont résistantes à l'apoptose induite par surcharge calcique, indiquant que le PTP serait un acteur important dans ce type de perméabilisation mitochondriale (voir partie correspondante).

Autre argument en défaveur du PTP, Bak interagit avec VDAC2, autre composant putatif du PTP, et cette interaction inhibe l'activation de Bak et son activité pro-apoptotique (Cheng et al., 2003).

Formation de pores protéiques par Bax et Bak eux-mêmes

Cette hypothèse prend sa source dans les observations structurales des protéines Bcl-2 multi-domaines qui assimilaient la structure des Bcl-2 à celle des pores bactériens (Muchmore et al., 1996).

En faveur de cette hypothèse, des oligomères de Bax sont capables de perméabiliser des liposomes formés in vitro puisque l'incubation des liposomes avec Bax conduit à la libération de la carboxy-fluorescéine encapsulée dans les liposomes (Antonsson et al., 1997; Schlesinger et al., 1997). Cependant, la composition des liposomes diffère de celle des membranes existant *in vivo* donc ce type de preuve reste incomplet. Quelques années plus tard, des travaux se basant sur du fractionnement cellulaire montrent que des fragments de Bax sont capables de percer des membranes mitochondriales (Annis et al., 2005). Aujourd'hui, les données penchent en faveur de pores de composition mixte, à la fois protéique et lipidique (**Figure 7**).

Formation de pores lipidiques

L'insertion de protéines dans la membrane peut modifier la topologie lipidique alentour et former ainsi des pores à composition majoritairement lipidique. Ce type de pore peut très bien résulter de l'oligomérisation de Bax et Bak et perméabiliser la membrane mitochondriale externe (**Figure 7**). En

effet, l'utilisation sur des bicouches lipidiques de peptides dérivés de Bax modifie les propriétés mécaniques membranaires et conduit à la formation de pores à composante majoritairement lipidique (García-Sáez et al., 2007; Guillemin et al., 2010; Qian et al., 2008). Dans un système in vitro développé plus récemment, des liposomes de composition proche de celle des membranes mitochondriales sont incubés avec Bax et tBid. En présence des deux protéines précédentes, il se forme des pores au niveau des liposomes et l'analyse de la composition de ces pores montre une quantité importante de lipides par rapport aux protéines, étayant l'hypothèse de la formation de pores lipidiques (Satsoura et al., 2012). Enfin, en microscopie haute résolution, les oligomères de Bax sont maintenant détectables et s'assemblent en anneaux à travers la membrane mitochondriale externe. Les anneaux seraient constitués à la fois de protéines et de lipides. De plus, ces anneaux corréleraient avec les sites de relargage du cytochrome c (Große et al., 2016; Salvador-Gallego et al., 2016). Ces dernières années et suite aux progrès de la microscopie, la tendance est de favoriser l'hypothèse de la formation de pores lipidiques, par rapport aux autres modèles. Cependant, on peut noter que les hypothèses des pores lipidiques ou protéiques induits par Bax et Bak ne sont pas mutuellement exclusives. Selon la taille des pores formés et celle des oligomères de Bax et Bak, il pourrait se former l'un ou l'autre type de pore, et de fait, il existe une certaine variabilité dans les pores formés par Bax (Große et al., 2016).

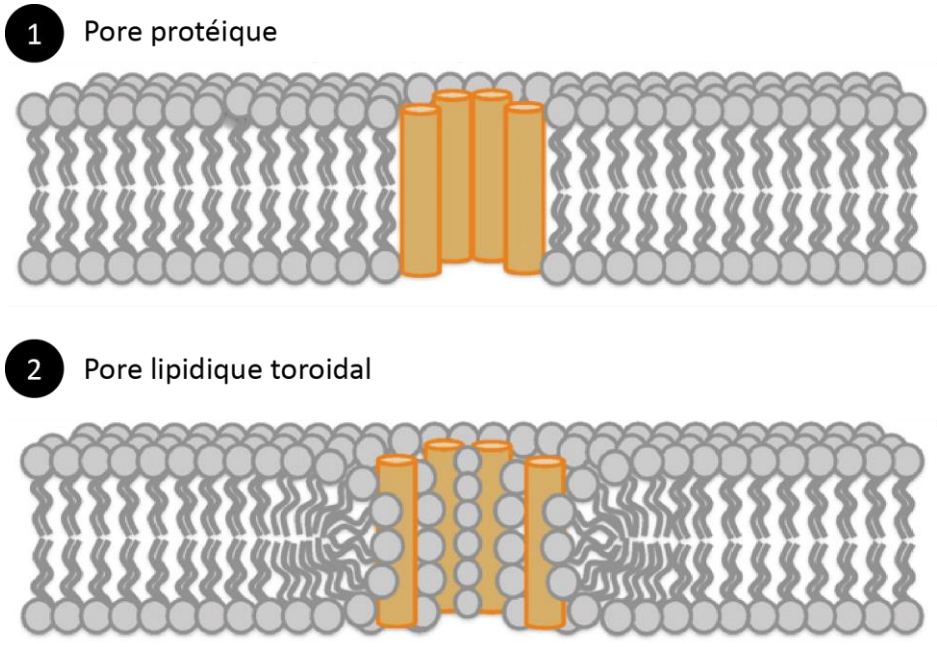


Figure 7: Modèles de formation de pores dans la MME par Bax et Bak

Dans le modèle du pore protéique, les hélices alpha (en jaune) des oligomères de Bax ou Bak sont jointives et aménagent une cavité centrale. Dans le modèle du pore lipidique toroidal, l'insertion des hélices alpha modifie localement la topologie membranaire, il se forme une cavité dont les bords sont de composition mixte, à la fois protéique et lipidique. D'après (Westphal et al., 2011).

b) Régulation de l'activation de Bax et Bak

Deux principaux mécanismes sont à l'origine de l'activation de Bax et Bak : des changements de conformation permettant l'oligomérisation d'une part, et la localisation de Bax à la mitochondrie d'autre part. Ces phénomènes sont finement contrôlés par les autres membres de la famille Bcl-2.

Précédents modèles d'activation de Bax et Bak

Dans le modèle d'activation directe, certaines protéines BH3-only sont capables d'induire directement l'activation de Bax et Bak. Les BH3-only activateurs sont principalement Bim et tBid, avec éventuellement Puma. Bim active Bax par interaction directe (Gavathiotis et al., 2008), tandis que tBid s'insère dans la membrane mitochondriale, recrute Bax à la mitochondrie et l'active (Lovell et al., 2008). Les autres protéines BH3-only (Bad, Bmf, Hrk, Puma, Noxa et Bik) activent Bax et Bak de façon indirecte (Chipuk et al., 2010). Plusieurs modèles d'activation indirecte ont été proposés. Dans le modèle de la sensibilisation, les BH3-only sensibilisateurs lient les anti-apoptotiques, ce qui libère les BH3-only activateurs de l'emprise des anti-apoptotiques (**Figure 8**). Les BH3-only activateurs induisent alors Bax et Bak. Dans le modèle de dé-repression, les BH3-only dé-represseurs se lient aux anti-apoptotiques, Bax et Bak ne sont plus séquestrés et sont capables de provoquer la perméabilisation mitochondriale sans activation préalable (Willis et al., 2007).

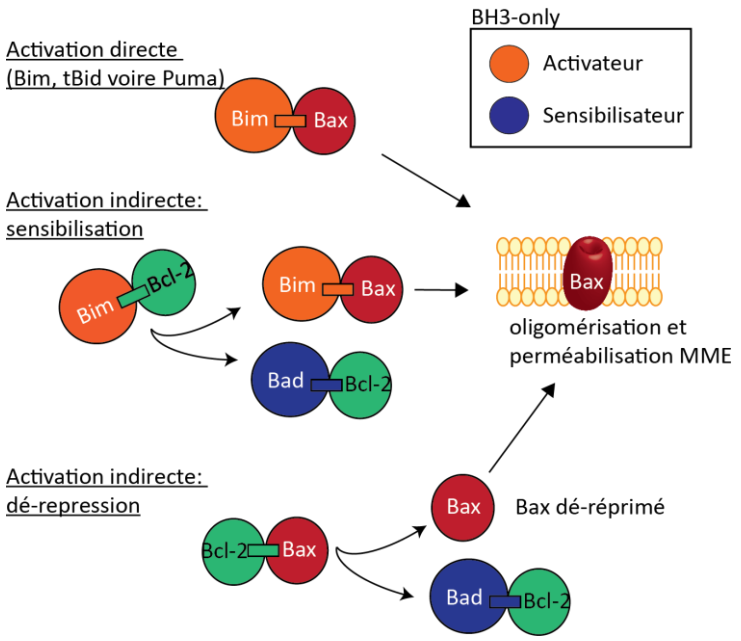


Figure 8: Modèles antérieurs d'activation de Bax et Bak

Modèle unifié ou comment réconcilier les modèles antérieurs

Dans une publication de 2011, Llambi et collègues proposent un modèle unifié récapitulant les modalités d'activation de Bax et Bak précédemment décrits (Llambi et al., 2011). Les travaux présentés se basent sur l'utilisation de protéines tBid recombinantes dont le domaine BH3 est remplacé par celui de Bim, de Bax ou de Bak. Les tBid recombinants sont co-exprimés avec Bcl-2, Bcl-xL ou Mcl-1 dans des cellules possédant soit Bax, soit Bak. Le relargage du cytochrome c dans le cytosol est ensuite évalué pour chaque condition. Les auteurs identifient ainsi 2 modes par lesquels les anti-apoptotiques inhibent Bax et Bak. Dans le mode 1, les anti-apoptotiques inhibent seulement les BH3-only activateurs alors que dans le mode 2, les anti-apoptotiques inhibent directement Bax et Bak (**Figure 9**). Dans les cellules, les deux modes co-existent, ce qui réunit les modèles en vigueur jusqu'alors.

Le modèle « embedded together » proposé par David Andrews stipule lui-aussi la coexistence de plusieurs modes d'activation mais se focalise sur l'importance de l'insertion des partenaires au niveau de la membrane mitochondriale externe, d'où l'expression « embedded together » (Leber et al., 2010). Des données plus récentes confirment l'existence des 2 modes d'inhibition décrits par Llambi et al, en particulier pour Bcl-xL. En comparant l'effet d'un mutant incapable de lier les BH3-only et d'un mutant incapable de lier à la fois les BH3-only et Bax et Bak, on peut observer que Bcl-xL inhibe Bax et Bak de façon directe mais aussi de façon indirecte par liaison avec les BH3-only (Chen et al., 2015). De plus dans cette étude, il est proposé pour Noxa un rôle de BH3-only activateur, tel que celui exercé par Bim, Bid ou Puma.

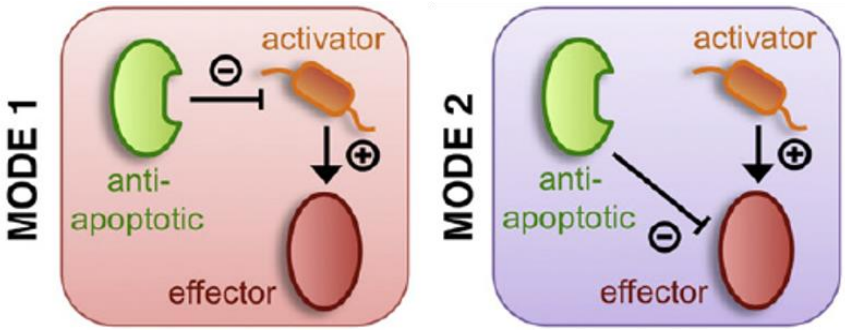


Figure 9: Modes d'action des anti-apoptotiques définis par Llambi et collègues.

Dans le mode 1, l'anti-apoptotique inhibe directement la protéine BH3-only activatrice. Dans le mode 2, l'anti-apoptotique inhibe directement le pro-apoptotique effecteur. D'après (Llambi et al., 2011).

Au sein du modèle unifié, il faut introduire un niveau de complexité supplémentaire, lié à la sélectivité qui existe entre les membres de la famille. Ainsi, toutes les protéines anti-apoptotiques ne sont pas capables de lier toutes les pro-apoptotiques multi-domaines, et vice versa. Willis et collègues montrent en effet que Bak, via son domaine BH3, est séquestré par Bcl-xL et Mcl-1, mais pas par Bcl-2 (Willis et al., 2005). De façon intéressante, l'inhibition concomitante de Mcl-1 (par traitement avec Noxa) et Bcl-xL (par KO) est nécessaire pour induire l'activité po-apoptotique de Bak. Ce type d'étude indique une redondance seulement partielle entre Bcl-xL, Mcl-1 et Bcl-2 dans l'exercice de la fonction anti-apoptotique.

De la même manière, les BH3-only se lient sélectivement à certains anti-apoptotiques et pas à d'autres. Les interactions possibles ont été typographiées par Chen et al, grâce à des expériences d'inhibition compétitive (Chen et al., 2005; voir également Certo et al., 2006). Il apparait que Bid, Bim et Puma peuvent lier tous les anti-apoptotiques alors que les autres montrent une sélectivité pour certains anti-apoptotiques (**Figure 10**).

Comment expliquer cette sélectivité des BH3-only vis-à-vis de certains anti-apoptotiques? La question est loin d'être triviale puisque tous interagissent avec les anti-apoptotiques via leur domaine BH3, domaine pourtant très conservé. Il semble que certains résidus qui diffèrent entre les domaines BH3 soient suffisants pour expliquer cette sélectivité. Ainsi, la phenylalanine 32 et la lysine 35 du domaine BH3 de Noxa restreignent la sélectivité de Noxa au seul Mcl-1. Lorsque ces deux résidus sont mutés, Noxa devient capable de lier Bcl-xL, Bcl-2 et Bcl-w en plus de Mcl-1 (Chen et al., 2005).

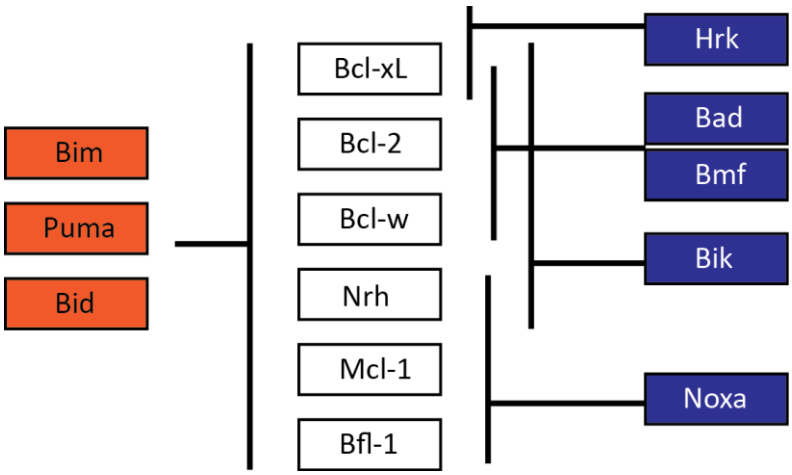


Figure 10: Sélectivité des BH3-only vis à vis des anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

Les BH3-only activateurs représentés en orange ciblent tous les anti-apoptotiques. Les BH3-only sensibilisateurs en bleu présentent des sélectivités restreintes. Ainsi Bik peut cibler quatre anti-apoptotiques alors que Hrk est spécifique de Bcl-xL. Schéma librement inspiré de (Chen et al., 2005)

En plus de la sélectivité différentielle, certaines protéines BH3-only montrent des préférences d'activation entre Bax ou Bak. En effet, les cellules KO pour Bak traitées avec le domaine BH3 de Bid sont en partie résistantes à la perméabilisation mitochondriale, comparées aux cellules sauvages traitées de la même façon. La perméabilisation mitochondriale médiée par Bid est en fait plus efficace avec Bak qu'avec Bax. Inversement, Bim active préférentiellement Bax par rapport à Bak (Sarosiek et al., 2013). De même, nous montrons que Puma et tBid montrent une préférence pour Bak (Lopez et al., 2016).
En tenant compte de la sélectivité et des préférences des membres de la famille Bcl-2, il apparaît que chaque protéine a un profil bien spécifique d'interaction au sein de la famille et que les apparentes redondances entre les membres de la famille n'en sont pas.

Au-delà de la perméabilisation induite par Bax et Bak, d'autres effecteurs peuvent provoquer la perméabilisation mitochondriale, tel que le calcium.

3. Perméabilisation mitochondriale calcium-dépendante

Les mitochondries sont des organites impliqués dans l'homéostasie calcique intracellulaire et contiennent du calcium à une concentration proche de celle du cytosol. Cependant, une surcharge de calcium mitochondrial peut provoquer l'ouverture du PTP. Le PTP est un canal protéique situé au niveau de la membrane mitochondriale interne et qui s'ouvre en présence de fortes concentrations en calcium dans la matrice mitochondriale. La composition moléculaire du PTP fait encore l'objet de débats. Le modèle classique stipule que le PTP serait constitué de la protéine matricielle Cyclophilin D, de la protéine ANT (Adenine Nucleotide Transporter) à la membrane interne et du canal VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) présent au niveau de la membrane mitochondriale externe (Lemasters et al., 2009). Cependant, les mitochondries de cellules KO pour ces gènes sont toujours capables de se perméabiliser après surcharge calcique, ce qui remet en cause leur rôle de constituants du PTP. Plus récemment, l'équipe de Bernardi propose un nouveau candidat moléculaire pour le PTP : l'ATP synthase F0F1, qui sous-forme de dimère, constituerait le PTP (Giorgio et al., 2013). Ces résultats sont corroborés par l'identification de la sous-unité c de la F0F1 ATPase comme étant le PTP. La sous-unité c forme en effet un anneau qui s'élargit en présence de fortes concentrations en calcium. Son KD provoque également une résistance des cellules à la mort induite par surcharge calcique (Alavian et al., 2014).
Suite à l'ouverture permanente du PTP, du calcium est largué en grande quantité dans l'espace intermembranaire. Par voie de conséquence, la phosphorylation oxydative est inhibée, la matrice

gonfle et la MME rompt. Les facteurs apoptogènes de l'espace intermembranaire (cf I.B.1.c) envahissent le cytosol et induisent l'activation des caspases : la cellule entre alors en apoptose.

Les protéines de la famille Bcl-2 régulent la perméabilisation mitochondriale dépendante du PTP de façon indirecte, par des interactions avec des canaux calciques au RE et à la mitochondrie qui modulent l'homéostasie calcique intracellulaire (Vervliet et al., 2016). Ce sujet est plus largement détaillé dans la partie II de cette introduction. On peut cependant suggérer que Bcl-xL est capable de contrôler le PTP et la perméabilisation calcium dépendante de façon plus directe. En effet, Bcl-xL interagirait directement avec l'ATP synthase F0F1 au niveau de la MMI et cette dernière est un constituant probable du PTP (Alavian et al., 2011).

C. Importance des Bcl-2 à l'échelle de l'organisme : étude des knockout chez la souris

Quelques années après la découverte des Bcl-2, les KO des gènes de la famille ont été générés chez la souris, révélant les rôles des différents Bcl-2 dans l'homéostasie tissulaire et le développement embryonnaire. Des KO dirigés exclusivement dans certains tissus ont ensuite permis de raffiner les observations initiales. Les modèles murins constituent également des outils importants pour la compréhension du rôle des Bcl-2 dans certaines maladies, en particulier les cancers (voir partie III).

1. Membres anti-apoptotiques

En 1993, deux publications parues dans Science et Cell rapportent le phénotype de souris KO pour *Bcl-2*. La première publication est basée sur des souris chimériques dont les cellules somatiques sont constituées à la fois de cellules sauvages et de cellules KO pour *Bcl-2*. Ce type de souris est obtenu par injection de cellules ES homozygote KO pour *Bcl-2* dans des blastocystes sauvages. Les individus ainsi générés ont un phénotype chimère. Les souris chimériques pour *Bcl-2* présentent des altérations de leur système immunitaire. En particulier, leurs lymphocytes T survivent mal en culture cellulaire *in vitro* et sont très sensibles à l'apoptose induite par irradiation aux rayons gamma ou traitement à la dexamethasone (glucocorticoïde) (Nakayama et al., 1993). De plus, un mois après leur naissance, les souris chimériques ne possèdent presque plus de lymphocytes T ou B, ce qui indique un rôle prépondérant de Bcl-2 dans la survie des lymphocytes après la naissance, mais pas au stade embryonnaire.

La seconde publication présente le phénotype de souris homozygotes KO pour *Bcl-2* (Veis et al., 1993). Ces souris ont été obtenues de la même manière que les souris chimériques, sauf que les individus

possédant des cellules germinales chimériques ont été croisés entre eux pour donner des souris entièrement KO pour *Bcl-2*. Les souris *Bcl-2* KO ont un développement embryonnaire apparemment normal. Les individus sont cependant petits et meurent pour la plupart quelques semaines après la naissance. Certains de leurs organes sont anormaux : les reins sont polykystiques, la peau et les phanères perdent leur pigmentation avec l'âge. Cependant, le phénotype le plus remarquable est celui du système immunitaire : le thymus et la rate subissent une apoptose importante, les lymphocytes meurent progressivement au cours de la vie adulte, conformément à l'étude précédente (**Tableau 2**). Ces travaux dans les souris soulignent l'importance de *Bcl-2* pour le maintien de la lignée lymphoïde. Toutefois, il existe une redondance entre les anti-apoptotiques au stade embryonnaire, puisque la délétion de *Bcl-2* n'a pas de conséquences pour le développement de l'embryon. De plus, la durée de vie très courte des souris KO n'a pas permis de caractériser le phénotype de souris plus âgées. L'importance de *Bcl-2* dans la vie adulte devra donc être évaluée à l'aide de KO conditionnels.

Le phénotype des souris *Bcl-x* KO est quant à lui beaucoup plus drastique car les embryons KO meurent au stade E13 (13 jours de développement) (Motoyama et al., 1995). En effet, les cellules du cerveau et de la moelle épinière meurent massivement par excès d'apoptose, ce qui arrête le développement de l'embryon. Par ailleurs, les lymphocytes immatures KO entrent davantage en apoptose que les sauvages. *Bcl-x* exerce donc un rôle clé dans la survie de cellules nerveuses et lymphoïdes immatures. Du fait de la létalité précoce des individus KO, des KO conditionnels de *Bcl-x* dans des tissus ciblés ont été rapidement générés. Les KO conditionnnels sont formés par délétion de gènes flanqués de sites loxP. Les sites loxP peuvent être recombinés entre eux par une Cre recombinase, ce qui élimine le gène d'intérêt et génère un KO. La Cre recombinase est placée sous le contrôle d'un promoteur inductible, ciblant l'expression de la recombinase dans un tissu spécifique. En utilisant ce type de système, des KO conditionnels de *Bcl-x* ont été générés dans les tissus du système immunitaire, du système nerveux, du système digestif ou encore de la peau (Sochalska et al., 2015). Parmi ces KO conditionnels, celui plaçant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur MMTV induit le KO de *Bcl-x* dans la peau, le tissu hématopoiétique et certains tissus sécréteurs comme le tissu mammaire (Wagner et al., 2000). De façon intéressante, ce système révèle la fonction cruciale de *Bcl-x* pour la survie des plaquettes, fonction cruellement impactée par l'utilisation de traitements ciblant plusieurs Bcl-2 anti-apoptotiques (voir partie III). Les mêmes souris ont servi à étudier l'effet de *Bcl-x* sur la glande mammaire adulte, puisque *Bcl-x* est le gène anti-apoptotique le plus exprimé dans ce tissu. De façon surprenante, la délétion de *Bcl-x* n'impacte pas le tissu mammaire adulte, ni au moment de la gestation, ni au moment de l'allaitement. Par contre, *Bcl-x* contrôle l'involution de l'épithélium mammaire à la fin de la période d'allaitement (Walton et al., 2001). *Bcl-x* est donc impliqué dans l'homéostasie du tissu mammaire sain, nous verrons que ce gène a également un rôle important dans les tumeurs mammaires.

Le KO de *Mcl-1* est lui-aussi létal au stade embryonnaire, mais de façon encore plus précoce que pour *Bcl-x*. Les embryons homozygotes KO meurent au stade 4 du fait de leur incapacité à s'implanter dans l'utérus maternel. Ces embryons isolés ne peuvent pas non plus se développer *in vitro*, contrairement aux sauvages ou hétérozygotes du même stade (Rinkenberger et al., 2000). Là encore, à cause de ce phénotype très sévère, des KO conditionnels de *Mcl-1* ont été largement développés, révélant un rôle crucial pour ce gène dans la survie des cellules du système immunitaire ou du système nerveux (Sochalska et al., 2015). Par contre, *Mcl-1* semble moins important que *Bcl-x* pour le maintien des cellules hématopoïétiques.

Nom du gène	Phénotype des souris KO
Bcl-2	Individus chétifs dont la plupart meurt quelques semaines après la naissance. Reins polykystiques, peau et phanères dépigmentés. Thymus et rate atrophiés, cellules lymphoïdes meurent progressivement après la naissance.
Bcl-x	Létal à E13. Mort massive des cellules du système nerveux central (cerveau et moelle épinière) ce qui provoque un arrêt du développement. Mort des cellules lymphoïdes immatures. KO conditionnel dans le tissu mammaire : défaut d'involution de l'épithélium mammaire après l'allaitement.
Mcl-1	Létal à E4. Défauts d'implantation dans l'utérus maternel. Embryons isolés incapables de se développer *in vitro*.
A1	KO des trois isoformes murin : phénotype mineur avec une baisse de 10 à 20% du nombre de LT et de DC.
Bcl-w	Mâles infertiles par dégénérescence des testicules.
Diva Boo	Pas de phénotype.

Tableau 2: Phénotypes des souris KO pour les gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

LT : lymphocytes T, DC : cellules dendritiques

Les autres anti-apoptotiques ne présentent pas de phénotype aussi marqué suite à leur délétion dans les souris. Ainsi, le KO des trois isoformes de *A1* (orthologue murin du gène *Bfl-1* de l'Homme) n'a presque pas d'incidence sur le phénotype, seuls quelques lymphocytes T mémoire et cellules dendritiques conventionnelles sont en nombre quelque peu réduit (10 à 20% de moins) par rapport aux souris contrôle (Schenk et al., 2017). Les souris *Bcl-w* KO sont normales, excepté pour la

spermatogénèse : les testicules des souris mâles dégénèrent avec l'âge et ne produisent pas de spermatozoïdes mâtures (Print et al., 1998). *Bcl-w* a vraisemblablement une fonction de survie redondante à celle des autres anti-apoptotiques, sauf en ce qui concerne la maturation des gamètes mâles. Enfin, bien que s'exprimant majoritairement dans l'ovaire, la délétion du gène *Diva-Boo* (orthologue de *Nrh*) chez la souris n'a aucun effet sur le phénotype, y compris celui des ovaires (Russell et al., 2002).

2. Membres pro-apoptotiques

Les phénotypes des souris *Bax* KO ou *Bak* KO sont peu altérés par rapport au phénotype sauvage. Les souris *Bax* déficientes présentent des hyperplasies des lymphocytes T et B immatures (**Tableau 3**). Les individus mâles sont infertiles du fait de l'absence de spermatozoïdes mâtures, alors que les spermatogonies sont anormalement abondantes mais malformées (Knudson et al., 1995). Les souris *Bak* KO ont un phénotype normal et sont fertiles (Lindsten et al., 2000). En revanche, les souris double KO pour *Bax* et *Bak* meurent pour la plupart 24h après la naissance. Les individus qui survivent ont un certain nombre d'anomalies : doigts mal individualisés, cerveau hypertrophié et lignées lymphoïdes et myéloïdes constituées d'un nombre anormal de cellules. Les femelles sont caractérisées par une absence de perforation vaginale et les mâles ont le même phénotype que les mâles *Bax* KO, à savoir infertilité due à une absence de spermatozoïdes mâtures. (Lindsten et al., 2000). *Bax* et *Bak in vivo* sont largement complémentaires puisque les délétions simples provoquent des phénotypes relativement mineurs. Par contre, la double délétion de ces gènes impacte la formation et l'homéostasie de certains organes, même si l'apoptose induite par *Bax* et *Bak* est également compensée par d'autres voies.

Pour ce qui est des BH3-only, la délétion de *Bim* dans les souris a donné le phénotype le plus remarquable. Une part des embryons *Bim* KO meurt au cours du développement, mais la pénétrance du phénotype dépend de la souche murine initiale. Les souris KO qui naissent ont un système immunitaire largement altéré, probablement par des défauts de la phase de contraction du système immunitaire suite à une infection. De ce fait, les souris déficientes pour *Bim* meurent vers l'âge de un an de maladies auto-immunes (Bouillet et al., 1999). *Bim* apparaît donc comme un régulateur prépondérant de l'homéostasie du système immunitaire.
Les souris *Bid* KO ont un phénotype normal mais sont résistantes à l'apoptose induite par Fas ligand (Yin et al., 1999). Sans surprise, les délétions des autres BH3-only ne donnent pas de phénotype notable, soulignant la redondance des fonctions exercées par ces gènes (Glab et al., 2017).

Nom du gène	Phénotype des souris KO
Bax	Hyperplasie des cellules lymphoïdes immatures. Infertilité mâle.
Bak	Pas de phénotype
Bax* et *Bak	Mort massive des individus 24h après la naissance. Doigts mal individualisés, cerveau hypertrophié, hyperplasie lignées lymphoïdes et myéloïdes. Femelles avec absence de perforation vaginale et mâles infertiles.
Bim	Excès de cellules immunitaires. Fréquence accrue de maladies auto-immunes.
Bid	Résistance à la voie extrinsèque de l'apoptose.
Autres BH3-only	Pas de phénotype.

Tableau 3: Phénotype des souris KO pour les gènes pro-apoptotiques de la famille Bcl-2

Les phénotypes des souris KO permettent de déduire dans quels tissus chaque membre de la famille contrôle l'apoptose des cellules. Cependant, ces études suggèrent aussi que les gènes de la famille peuvent exercer d'autres fonctions. En particulier, on a vu dans le paragraphe précédent que le KO de *Mcl-1* produisait des défauts d'implantation des embryons au stade blastocyste. Mais de façon notable, ce défaut ne semble pas relever d'un problème d'apoptose, puisque les embryons *Mcl-1* KO ont le même nombre de cellules apoptotiques que les embryons hétérozygotes ou sauvages. De ce fait, *Mcl-1* exerce vraisemblablement d'autres fonctions que celle du strict contrôle de l'apoptose.

II. Les fonctions non-canoniques des protéines Bcl-2

A. Vers de nouvelles fonctions pour les protéines Bcl-2

1. Contrôle du cycle cellulaire

Les cellules peuvent se maintenir dans l'organisme sans se diviser, on dit alors que ces cellules sont en phase quiescente ou G0. Au contraire, elles peuvent se diviser activement. Dans ce cas, les cellules alternent différentes phases, appelées phases du cycle cellulaire. Un cycle commence avec la phase G1, ensuite la phase S (réplication de l'ADN), puis la phase G2 à l'issue de laquelle les cellules entrent en mitose, phase de division cellulaire *sensu stricto*.

Les premières preuves de l'implication des protéines Bcl-2 dans le cycle cellulaire sont présentées dès 1996. La surexpression de Bcl-2 dans des thymocytes de souris ralentit le cycle cellulaire, en particulier, l'entrée des cellules en phase S est retardée (**Figure 11**). Bcl-2 empêche le facteur de transcription NFAT d'aller dans le noyau et de transcrire ses gènes cibles, parmi lesquels l'interleukine 2 (IL2) qui contrôle la transition G1/S (Linette et al., 1996). De façon similaire, l'entrée en phase S des lymphocytes T, lymphocytes B et des fibroblastes quiescents est retardée par surexpression de Bcl-2 ou de Bcl-xL (O'Reilly et al., 1996). Par ailleurs, les fonctions de survie et de contrôle du cycle cellulaire sont indépendantes. En effet, une mutation de la tyrosine 28 du domaine BH4 de Bcl-2 n'a pas d'effet sur la fonction anti-apoptotique de Bcl-2 mais abolit son activité sur le cycle cellulaire. En mutant la tyrosine analogue de Bcl-xL et Bcl-w, on obtient le même résultat (Huang et al., 1997).

Les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont également impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Ainsi la surexpression de Bax dans des thymocytes activés par l'IL2 accélère l'entrée des cellules en phase S (Brady et al., 1996), en miroir de ce qui a été observé pour les anti-apoptotiques.

Les protéines de la famille Bcl-2 (Bcl-2 et Bcl-xL mais également Bax et Bak) contrôlent la phase de quiescence des cellules, en stabilisant la protéine p27 par phosphorylation (Janumyan et al., 2008).

Il est intéressant de souligner que la phosphorylation des protéines Bcl-2 varie selon les phases du cycle cellulaire. Ainsi, Bcl-2 est phosphorylée pendant l'arrêt mitotique induit par le taxol, de la même façon que le complexe cycline B/cdk1 qui contrôle la transition G2/M (Scatena et al., 1998). La phosphorylation de Bcl-xL varie elle-aussi au cours du cycle cellulaire. En particulier, Bcl-xL phosphorylée au niveau de la sérine 49 s'accumule lors d'un arrêt mitotique en phase G2/M déclenché par des dommages à l'ADN. La protéine phosphorylée à cette étape du cycle co-localise avec la gamma tubuline au niveau des centrosomes, ce qui résulte en une inhibition de l'activité kinase de la cdk1 (Wang et al., 2011). En début de mitose, Bcl-xL est phosphorylée cette fois au niveau de la sérine 62 et

contribue à la mise en place du fuseau mitotique, puisque le mutant phospho-déficient Bcl-xL S62A induit une désorganisation des microtubules mitotiques (Wang et al., 2014).

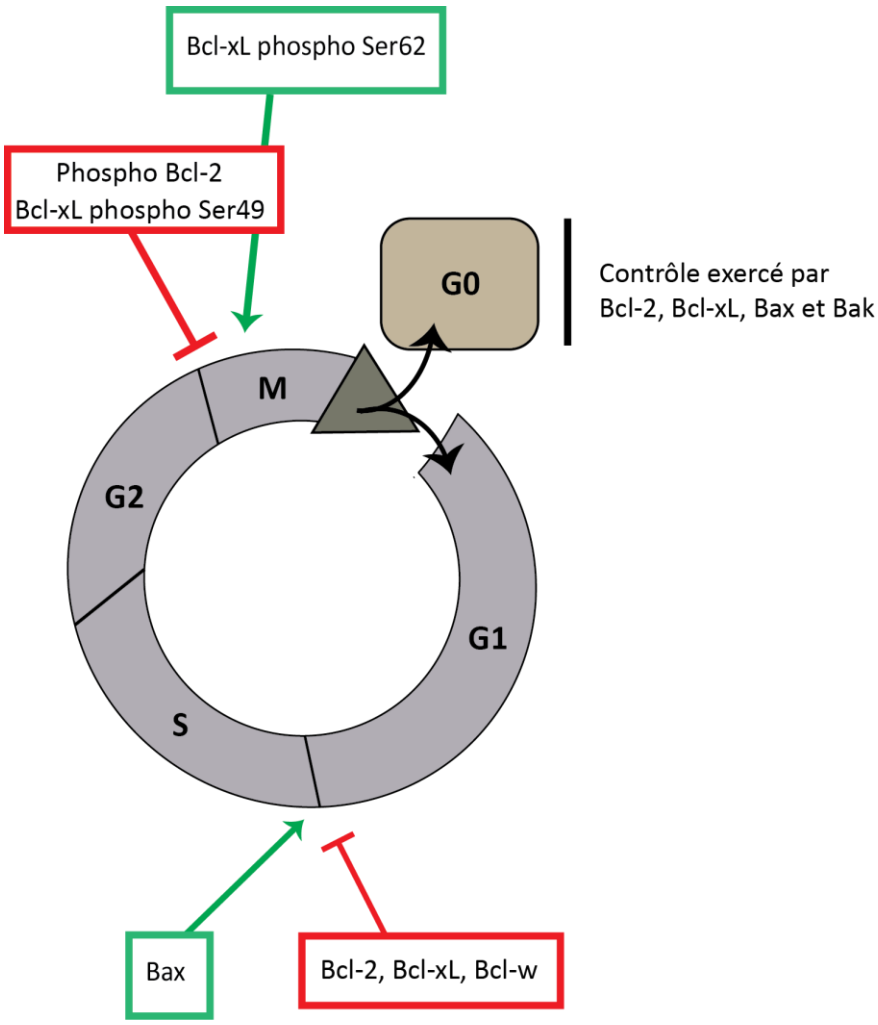


Figure 11: Quelques effets des protéines Bcl-2 sur le cycle cellulaire

De façon générale, les anti-apoptotiques ralentissent le cycle cellulaire (en rouge), alors que les pro-apoptotiques ont tendance à l'accélérer (en vert). Les transitions entre deux phases du cycle sont représentées par les barres noires. M : Mitose, S : phase de réplication de l'ADN.

2. Les protéines Bcl-2 contrôlent le métabolisme glycolytique et mitochondrial

Ainsi que je l'ai discuté dans la partie I.A.3, la majorité des protéines Bcl-2 connaît, au moins en partie, une localisation cytosolique et mitochondriale. Or, ce sont les deux compartiments dans lesquels se déroule la majorité des réactions métaboliques cellulaires. De fait, plusieurs études relient les protéines Bcl-2 au métabolisme.

La protéine Bad a été particulièrement étudiée pour son implication dans le métabolisme. Cette protéine BH3-only interagit avec la glucokinase des cellules hépatiques (première enzyme de la glycolyse) et contrôle ainsi directement la glycolyse de ces cellules. De plus, l'effet de Bad sur le métabolisme est dépendant de sa phosphorylation puisqu'un mutant non-phosphorylable de cette protéine est incapable d'interagir avec la glucokinase (Danial et al., 2003). De même, Bad phosphorylée sur la thréonine 102 interagit avec une autre enzyme de la glycolyse, la phosphofructokinase 1 (PFK1), et augmente son activité enzymatique (Deng et al., 2008). Enfin, Bad est considérée comme un régulateur important des sources de métabolites utilisés par les neurones, en favorisant la consommation de glucose au détriment de celle des corps cétoniques (Giménez-Cassina and Danial, 2015).

La protéine BH3-only Noxa est quant à elle activée sous divers stress cellulaires tels que la privation en glucose. Cependant, il s'avère que Noxa contrôle le métabolisme glucidique des cellules saines. En effet, Noxa est phosphorylée dans les cellules saines par cdk5, ce qui engendre sa localisation cytosolique. Au niveau de ce compartiment, Noxa promeut la consommation de glucose par les cellules, en dirigeant ce dernier dans la voie des pentoses phosphate, et non dans la glycolyse comme c'est le cas pour Bad (Lowman et al., 2010).

Les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques sont également des régulateurs du métabolisme, mais il semble que leur activité se concentre surtout au niveau de la mitochondrie.

Mcl-1 est ainsi détectée au niveau de la membrane mitochondriale externe mais aussi de la matrice, où une forme tronquée en N-terminal de Mcl-1 est présente. Alors qu'un mutant restreignant Mcl-1 à la membrane externe contrôle l'apoptose, un mutant ciblant Mcl-1 à la matrice active le métabolisme mitochondrial. De plus, la délétion de Mcl-1 engendre des déficits de respiration dûs à des défauts d'expression et d'assemblage des composants de la chaîne respiratoire (Perciavalle et al., 2012). Par conséquent, Mcl-1 et en particulier sa forme tronquée, est un régulateur crucial de la respiration au niveau de la mitochondrie (**Figure 12**).

Bcl-2 augmente également la respiration, en activant la cytochrome c oxydase (COX), autre composant de la chaîne respiratoire (Chen and Pervaiz, 2007). Bcl-2 interagit en fait directement avec la sous-unité Va de la COX, interaction principalement médiée par le domaine BH2 de Bcl-2. Bcl-2 favorise ainsi la

localisation mitochondriale de COX, par rapport à sa localisation nucléaire. Il est intéressant de noter qu'en conditions de stress oxydatif, Bcl-2 a l'effet inverse : il inhibe la COX via ses domaines Va et Vb, ce qui protège la cellule d'une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS, molécules qui sont toxiques pour la cellule (Chen and Pervaiz, 2009).

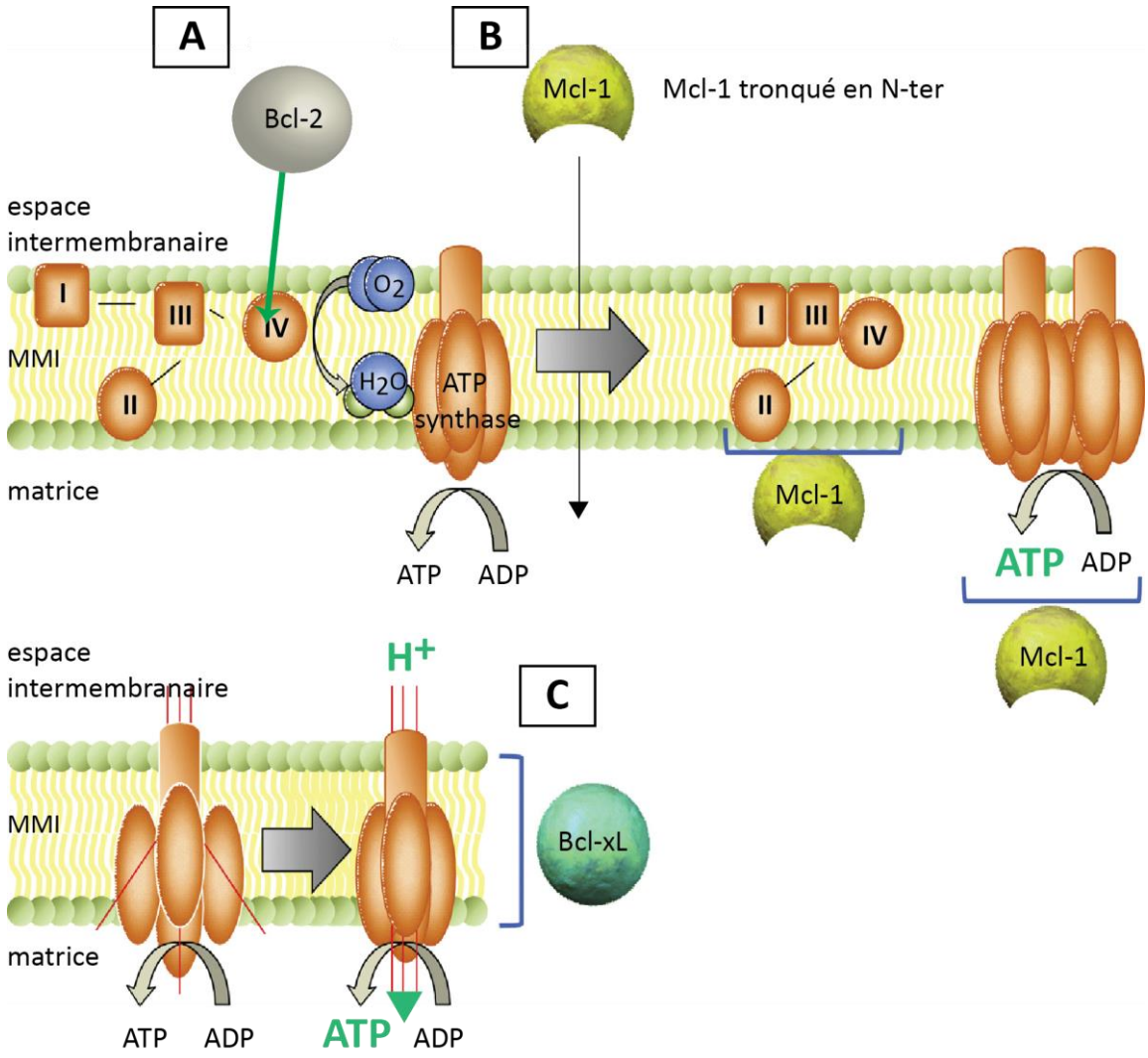


Figure 12: Activation du métabolisme mitochondrial par Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1

***A** : Bcl-2 active le complexe IV de la chaîne respiratoire (cytochrome c oxydase). **B** : Mcl-1 tronquée active l'assemblage de la chaine respiratoire et la production d'ATP. **C** : Bcl-xL interagit avec la sous-unité béta de l'ATP synthase et active la synthèse d'ATP. Adapté de (Giménez-Cassina and Danial, 2015).*

Tout comme Bcl-2 et Mcl-1, Bcl-xL est présente à la membrane mitochondriale externe. De récentes études situent cette protéine également à la membrane interne, où elle interagit avec la sous-unité béta de l'ATP synthase F0F1 et régule le potentiel de la membrane mitochondriale interne (Alavian et al., 2011; Chen et al., 2011). Par ailleurs, le métabolome des cellules surexprimant Bcl-xL diffère de celui des cellules contrôle. En particulier, la quantité d'acétylCoA est plus faible dans les cellules surexprimant Bcl-xL, ce qui conduit à une hypoacétylation globale des protéines dans ces cellules (Yi et al., 2011). Cependant, le rôle métabolique de Bcl-xL est envisagé dans cette étude en lien avec sa fonction apoptotique, et non comme une fonction à part entière.

En guise de modèle, Atan Gross propose que les protéines Bcl-2 agissent comme des senseurs métaboliques. En effet, ces protéines naviguent entre les différents compartiments cellulaires, faisant ainsi le lien entre métabolisme mitochondrial et cytosolique. De plus, les Bcl-2 peuvent se localiser au noyau. On peut alors supposer que ces protéines pourraient transmettre des informations mitochondriales ou cytosoliques au noyau, permettant aux cellules d'adapter leur métabolisme en conséquence (Gross, 2016).

3. Dynamique mitochondriale et protéines Bcl-2 : des effets réciproques

Les mitochondries forment un réseau qui change constamment de forme, que ce soit dans les cellules saines ou lors de l'apoptose. Ces organites peuvent en effet fusionner sous le contrôle des protéines de la famille des mitofusines (Mfn). Inversement, des fissions mitochondriales peuvent se produire, principalement contrôlées par les protéines Drp1 et Opa1. Les protéines de la famille Bcl-2 semblent impliquées dans les deux processus (Martinou and Youle, 2011).

Le premier lien établi entre la dynamique mitochondriale et les protéines Bcl-2 résulte des études sur l'apoptose. Dans un premier temps, il a été observé par immunofluorescence dans des cellules en apoptose que les oligomères de Bax se localisaient principalement au niveau des sites de fission mitochondriale (Karbowski et al., 2002). Plus récemment, Montessuit et collègues évaluent l'oligomérisation de Bax par sa capacité à résister à une digestion par la trypsine. Par cette technique, ils montrent que Drp1 provoque l'oligomérisation de Bax, connectant ainsi la formation d'oligomères de Bax et de sites de fission mitochondriaux (Montessuit et al., 2010). En plus des évènements de fission, la taille des mitochondries est un autre élément clé dans l'activation de Bax. De fait, si les mitochondries sont trop fragmentées donc de trop petite taille, Bax n'est plus capable de perméabiliser la membrane mitochondriale externe (Renault et al., 2015).

En dehors de l'apoptose, les protéines Bcl-2 participent à la dynamique mitochondriale des cellules saines. En effet, les mitochondries des MEFs déficientes pour Bax et Bak sont davantage fragmentées que celles des cellules sauvages. Au contraire, la surexpression de Bax empêche la fission mitochondriale induit par une protéine virale, le vMIA (viral Mitochondria-associated Inhibitor of Apoptosis). En termes mécanistiques, Bax active la fusion mitochondriale en restreignant la localisation de la mitofusine2 aux sites de fusion sur la mitochondrie. Parallèlement, Bax décroit la mobilité membranaire de Mfn2 (Karbowski et al., 2006). Dans les cellules saines, seule la forme cytosolique de Bax contrôle la fusion mitochondriale via Mfn2, indiquant que le contrôle de la dynamique mitochondriale exercé par Bax est dépendant de sa localisation subcellulaire (Hoppins et al., 2011).
Parmi les anti-apoptotiques, Bcl-xL régule la dynamique mitochondriale dans les neurones. Les neurones surexprimant Bcl-xL ont des mitochondries plus allongées alors que les neurones Bcl-xL KO présentent des mitochondries fragmentées. Bcl-xL active la fusion mitochondriale dans les neurones mais également la fission, par l'intermédiaire de Drp1. De plus, les cellules surexprimant Bcl-xL ont une plus grande quantité de mitochondries et cette augmentation de la biomasse mitochondriale favorise la formation d'un réseau de mitochondries moins fragmenté (Berman et al., 2009). Mcl-1 contrôle la dynamique mitochondriale par interaction avec Drp1 (Morciano et al., 2016).

4. Les Bcl-2 dans la physiologie neuronale

Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL sont particulièrement importantes pour la survie du système nerveux durant le développement embryonnaire. Pendant la vie adulte, Bcl-xL exerce un rôle prépondérant pour le contrôle de l'apoptose des cellules du système nerveux.
Les protéines Bcl-2 régulent également la plasticité neuronale, c'est-à-dire la capacité des neurones à changer leur structure ou leur réponse aux stimulations des autres neurones. Ainsi, Bcl-2 augmente la régénération des axones après une blessure. Cette fonction est indépendante de la fonction de survie de Bcl-2, puisque le traitement par le z-VAD fmk (inhibiteur des caspases) mime l'effet de survie exercé par Bcl-2 mais pas son effet régénérant (Chen et al., 1997).
Bcl-xL semble jouer sur la transmission synaptique, c'est-à-dire la transmission de l'influx nerveux d'un neurone à un autre (Jonas, 2006). Lorsque Bcl-xL est injecté dans le neurone pré-synaptique, le potentiel du neurone post-synaptique augmente en fréquence (Jonas et al., 2003). Par ailleurs, toujours au niveau de la synapse, Bcl-xL favorise l'endocytose des vésicules synaptiques, de façon indépendante de son action sur le métabolisme ou l'apoptose. Sous le contrôle de la calmoduline, Bcl-xL forme un complexe avec Drp1 et les molécules de clathrine recouvrant les vésicules d'endocytose en formation (Li et al., 2013). Bcl-xL exerce donc une fonction synaptique dans les neurones. De façon similaire, la délétion de Bak dans les souris modifie la transmission synaptique (Fannjiang et al., 2003).

5. Autophagie et mitophagie

L'autophagie est un processus de recyclage des composants cellulaires au sein de vésicules appelées autophagosomes. Les autophagosomes sont produits à partir des membranes mitochondriales, du RE ou de la membrane plasmique. La formation des vésicules est initiée au niveau de sites de liaison d'un complexe protéique comprenant notamment Beclin-1. Les composants recyclés dans les autophagosomes sont de taille variée, des macromolécules aux organites telles que les mitochondries (on parle alors de mitophagie). L'autophagie se produit dans les cellules saines, cependant un excès d'autophagie peut provoquer la mort cellulaire. Cette dualité conduit à distinguer deux contextes cellulaires : un contexte de survie où l'autophagie intervient en tant que processus de maintien de l'homéostasie cellulaire, et un contexte de mort où l'autophagie massive du contenu cellulaire détruit la cellule. Les protéines de la famille Bcl-2 régulent l'autophagie dans ces deux contextes.

Dans le contexte de la mort cellulaire autophagique, les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 exercent un rôle protecteur. Ainsi, Bcl-2 interagit avec Beclin-1. De façon remarquable, la protéine Beclin-1 comporte un domaine BH3. Bcl-2 lie Beclin-1 de la même façon qu'avec les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 : le domaine BH3 de Beclin-1 interagit avec la poche hydrophobe de Bcl-2. De plus, Bcl-2 spécifiquement ciblé au RE inhibe l'autophagie en séquestrant Beclin-1 alors que Bcl-2 mitochondrial n'a pas cette fonction. Là encore, la spécialisation fonctionnelle de Bcl-2 est en partie liée à sa localisation subcellulaire (Pattingre et al., 2005). Tout comme Bcl-2, Bcl-xL est un inhibiteur de l'autophagie capable de séquestrer directement Beclin-1. En cas de privation en sérum, Bad est activé et inhibe Bcl-xL, ce qui engendre l'activation de Beclin-1 et augmente l'autophagie (Maiuri et al., 2007).

Dans le contexte cellulaire où l'autophagie est un processus favorable à la survie, le rôle de Bcl-2 et Bcl-xL est inversé. En effet, la surexpression de Bcl-xL ou Bcl-2 dans des cellules HCT116 Bax KO active la formation d'autophagosomes, lorsque les cellules sont incubées dans le milieu HBSS (privation en nutriments). De plus, Bcl-xL stimule davantage l'autophagie que Bcl-2. L'activation de l'autophagie par Bcl-2 et Bcl-xL dans ce contexte est par ailleurs indépendante de Beclin-1 (Priault et al., 2010).

Enfin, la balance entre anti-apoptotiques et pro-apoptotiques contrôle plus spécifiquement la mitophagie (Gross and Katz, 2017).

6. Migration/invasion (détaillé partie III)

Les fonctions de migration/invasion des protéines Bcl-2 sont discutées partie III.B.4 et font l'objet de mon travail de thèse.

Dans cette première sous-partie, j'ai détaillé un certain nombre de fonctions, parfois en partie liées à la régulation de l'apoptose, qui approfondissent notre vision de la famille des protéines Bcl-2. Le lien entre les différentes fonctions reste à être plus clairement établi. Dans notre équipe, nous proposons que la capacité des protéines Bcl-2 à réguler l'homéostasie calcique intracellulaire pourrait constituer le lien manquant entre toutes ces fonctions (Bonneau et al., 2013). En effet, le cycle cellulaire, le métabolisme mitochondrial, la physiologie neuronale ou encore la migration cellulaire sont largement dépendants du calcium. Par conséquent, dans la suite de cette seconde partie, je détaille les bases de l'homéostasie calcique cellulaire, ainsi que la façon dont les protéines Bcl-2 la régissent.

B. Quelques propriétés de l'homéostasie calcique des cellules non-excitables

1. Le calcium dans les cellules : concentrations et organites de stockage

L'ion calcium est un second messager intracellulaire, simple et versatile, impliqué dans la régulation de nombreux processus tels que l'exocytose, l'activation de voies de signalisation, le métabolisme, l'adhésion et les mouvements cellulaires... La concentration basale en calcium cytosolique est de l'ordre de 10^{-7}mol/L, cependant cette concentration peut s'élever jusqu'à 10^{-5}mol/L. Les oscillations calciques cytosoliques peuvent concerner l'ensemble du cytoplasme ou être locales mais sont surtout transitoires, c'est-à-dire que le calcium excédentaire est rapidement éliminé. Ces propriétés font du calcium un messager capable de réguler les processus cellulaires à la fois dans l'espace et dans le temps (Alberts et al., 2002). Le calcium est par ailleurs un élément abondant dans le milieu extracellulaire où sa concentration est estimée à 10^{-3}mol/L. Le différentiel de concentration entre intracellulaire et extracellulaire suggère que la concentration calcique cytosolique est en permanence régulée par rapport au milieu extracellulaire. Par ailleurs, l'augmentation transitoire du calcium cytosolique peut être due à une entrée de calcium depuis le milieu extracellulaire ou à un relargage de calcium contenu dans les organites intracellulaires.

Le réticulum endoplasmique est le principal organite de stockage du calcium, tandis que la mitochondrie en contient également une grande quantité. D'autres organites tels que les endosomes, les lysosomes ou l'appareil de Golgi (Pinton et al., 1998) constituent des espaces de stockage de cet ion. Cependant, leur importance dans l'homéostasie calcique intracellulaire est réduite par rapport aux rôles prépondérants du RE et de la mitochondrie.

Les membranes cellulaires sont peu perméables aux ions calcium, de ce fait, le passage du calcium depuis le milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire, ou entre compartiments intracellulaires nécessite la présence de canaux transmembranaires. Dans le paragraphe suivant, je détaille les modes de fonctionnement des principaux systèmes de transport du calcium cellulaire, en insistant sur ceux qui font l'objet d'une régulation par les protéines de la famille Bcl-2.

2. Systèmes de transport du calcium cellulaire

a) Transports au niveau de la membrane plasmique

Dans les cellules non-excitables, l'entrée de calcium extracellulaire dans le cytoplasme s'effectue essentiellement via des canaux dont l'ouverture ne dépend pas du potentiel transmembranaire. Parmi ces canaux, on retrouve la grande famille des canaux TRP (Transient Receptor Potential) qui compte sept sous-groupes. Les TRP sont perméables aux cations de façon non-sélective, même si certains membres de la famille transportent exclusivement des ions Ca^{2+} (exemple : TRPV5 et 6). Les TRP sont activés par de nombreux stimuli : signaux chimiques ou mécaniques, température, pression osmotique, pH (Nilius and Owsianik, 2011).

Un autre mécanisme d'entrée du calcium extracellulaire dans les cellules repose sur l'association entre une protéine de la membrane plasmique (Orai1) et une protéine réticulaire (de la famille STIM), suite à la déplétion des stocks calciques dans le RE. Ces déplétions sont reconnues par le canal STIM1 qui va alors s'accumuler au niveau des jonctions entre le RE et la membrane plasmique. Là, STIM1 interagit avec le canal Orai1, induisant l'ouverture de ce dernier et le passage de calcium du milieu extracellulaire vers le cytosol. Ce calcium excédentaire est pompé par la pompe Serca du RE, provoquant ainsi un retour à la normale (**Figure 13**) (Prakriya and Lewis, 2015).

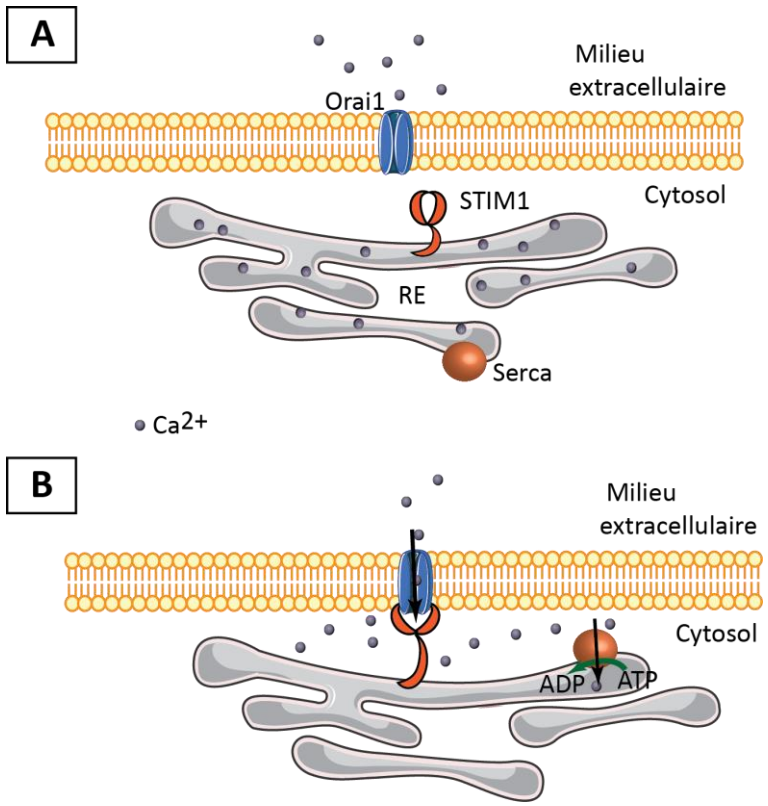


Figure 13: Fonctionnement du SOCE

***A** : En conditions standard, le RE et le milieu extracellulaire sont riches en calcium. Orai1 (en bleu) et STIM1 (en orange) sont inactifs. **B** : Lorsque le stock calcique du RE est vide, STIM1 et Orai1 forment un complexe conduisant à l'ouverture de Orai1 et à l'entrée de calcium dans le cytosol. Ce calcium est pompé par la pompe ATP-dépendante Serca et le stock de calcium réticulaire ainsi reconstitué.*

La concentration calcique cytosolique est dix mille fois plus faible que celle du milieu extracellulaire. Même si la membrane plasmique est très peu perméable aux ions, quelques ions calcium traversent la membrane, conformément à leur gradient électrochimique, c'est-à-dire depuis le milieu extracellulaire (milieu le plus concentré) vers le milieu intracellulaire (le moins concentré). De ce fait, le maintien de faibles concentrations calciques cytosoliques nécessite un export permanent du calcium vers les organites ou l'extracellulaire. Au niveau de la membrane plasmique, cette fonction est assurée par la pompe ATP-dépendante PMCA (Plasma Membrane Calcium ATPase) qui expulse des ions Ca^{2+} du cytosol vers l'extracellulaire. L'échangeur sodium/calcium (NCX) présent sur la membrane plasmique participe également à cette fonction : au niveau de l'échangeur, trois ions Na^{+} sont importés en échange de l'exportation d'un ion Ca^{2+} (Déliot and Constantin, 2015).

b) Transports de calcium à travers le RE

Le RE est le premier organite de stockage du calcium, on estime que la concentration en calcium de ce compartiment se situe entre 100µmol/L et 1mmol/L, soit 10 000 fois plus que pour le cytosol. La mesure de cette concentration reste imprécise car il est difficile de distinguer le calcium présent sous forme libre dans le RE de celui qui est lié aux protéines séquestrant le calcium, telles que la calréticuline et la calséquestrine (Gerasimenko et al., 2014). Ces protéines possèdent des domaines dits à main EF sur lesquels se fixent les ions Ca^{2+}. Elles sont caractérisées par une faible affinité pour le calcium mais une forte capacité de stockage, ce qui permet de lier ou de relâcher le calcium selon la quantité de calcium libre réticulaire. Le calcium réticulaire peut être libéré dans le cytosol en réponse à des stimuli provoquant l'ouverture des canaux calciques réticulaires : le Récepteur à la Ryanodine (RyR) et le récepteur à l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP3R).

Le récepteur à la Ryanodine

Le récepteur à la Ryanodine forme des tétramères dans la membrane du RE. Chez l'Homme, il existe trois isoformes de RyR, notés RyR1 à RyR3. Dans les cellules non-musculaires, l'ouverture du canal est activée par fixation de l'ADP ribose cyclique, produit à partir du NAD+ sous l'effet d'une ADP cyclase. Ainsi, la caféine est un agoniste de RyR qui provoque la formation d'ADP ribose cyclique et l'ouverture de RyR. Le canal peut également s'ouvrir par un mécanisme CICR (Calcium-Induced Calcium Release) : une élévation du calcium cytosolique à proximité du RyR constitue un signal d'ouverture de ce canal. Une fois le canal ouvert, le calcium circule selon son gradient électro-chimique, donc sort du RE en direction du cytoplasme (Krebs et al., 2015).

Le récepteur à l'IP3

L'inositol 1,4,5 triphosphate (IP3) est produit par dégradation du phospho-inositol biphosphate membranaire (PIP2) sous le contrôle d'une phospholipase C. L'IP3 a été décrit dans les années 80 comme un facteur responsable de la mobilisation du calcium des organites de stockage intracellulaire (Streb et al., 1983). Cependant, c'est seulement sept ans plus tard que le récepteur à l'IP3 est identifié comme étant la protéine P400, une protéine réticulaire (Maeda et al., 1990). Dorénavant nommé IP3R, le canal est une protéine de 2749 acides aminés qui s'assemble en tétramères (**Figure 14**). Le tétramère s'ouvre après fixation de l'IP3 ou d'ions calcium (mécanisme CICR dans ce dernier cas), ce qui a pour conséquence un efflux de calcium depuis le RE vers le cytosol. Trois isoformes de IP3R, nommés IP3R1 à 3, existent chez les vertébrés. Les trois isoformes s'expriment ensembles dans la plupart des types cellulaires des mammifères et diffèrent par leur affinité vis-à-vis de l'IP3; IP3R2 ayant le Kd le plus faible alors que IP3R3 a celui le plus fort (Newton et al., 1994).

Au sein d'un monomère de récepteur à l'IP3, plusieurs domaines fonctionnels sont définis. Leur délimitation a été effectuée à partir de la séquence de l'isoforme IP3R1 chez la souris (**Figure 14**). L'IP3 se fixe au niveau du domaine central de liaison à l'IP3 (acides aminés 226 à 578). De façon intéressante, ce domaine seul présente la même affinité pour l'IP3, quel que soit l'isoforme d'IP3R. Le domaine de liaison est précédé du domaine suppresseur (acides aminés 1 à 225). Contrairement à ce qui a été mesuré pour les domaines de liaison seuls, les domaines suppresseurs et de liaison fusionnés n'ont plus la même affinité pour l'IP3 selon l'isoforme concerné. De plus, leurs Kd sont proches de ceux calculés pour les protéines totales. Ainsi, le domaine suppresseur de chaque isoforme détermine l'affinité de chaque récepteur pour l'IP3 (Iwai et al., 2007). Le domaine suppresseur est également un régulateur de l'ouverture du canal, puisqu'un mutant déficient pour les acides aminés 1 à 223 n'est plus capable de conduire les ions calcium alors que l'IP3 s'y fixe (Uchida et al., 2003).

Le domaine modulateur et de transduction est un grand domaine comportant les acides aminés 579 à 2249 et qui relie le domaine de liaison à l'IP3 au domaine canal. Tout comme pour le domaine suppresseur, la délétion de ce domaine conduit à l'abolition de l'ouverture de IP3R, même lorsque IP3 se lie au canal muté (Uchida et al., 2003). Le domaine modulateur apparait donc comme un élément important pour l'ouverture de IP3R. De plus, ce domaine comporte des sites de liaison de nombreux régulateurs du récepteur à l'IP3.

Le domaine canal contient six segments transmembranaires et correspond aux acides aminés 2250 à 2590. C'est au niveau de ce domaine que les ions calcium traversent la membrane réticulaire. Enfin, le dernier domaine défini est le domaine de couplage (acides aminés 2590 à 2749), nommé ainsi car il rapproche le domaine de liaison à l'IP3 du domaine canal (Fan et al., 2015).

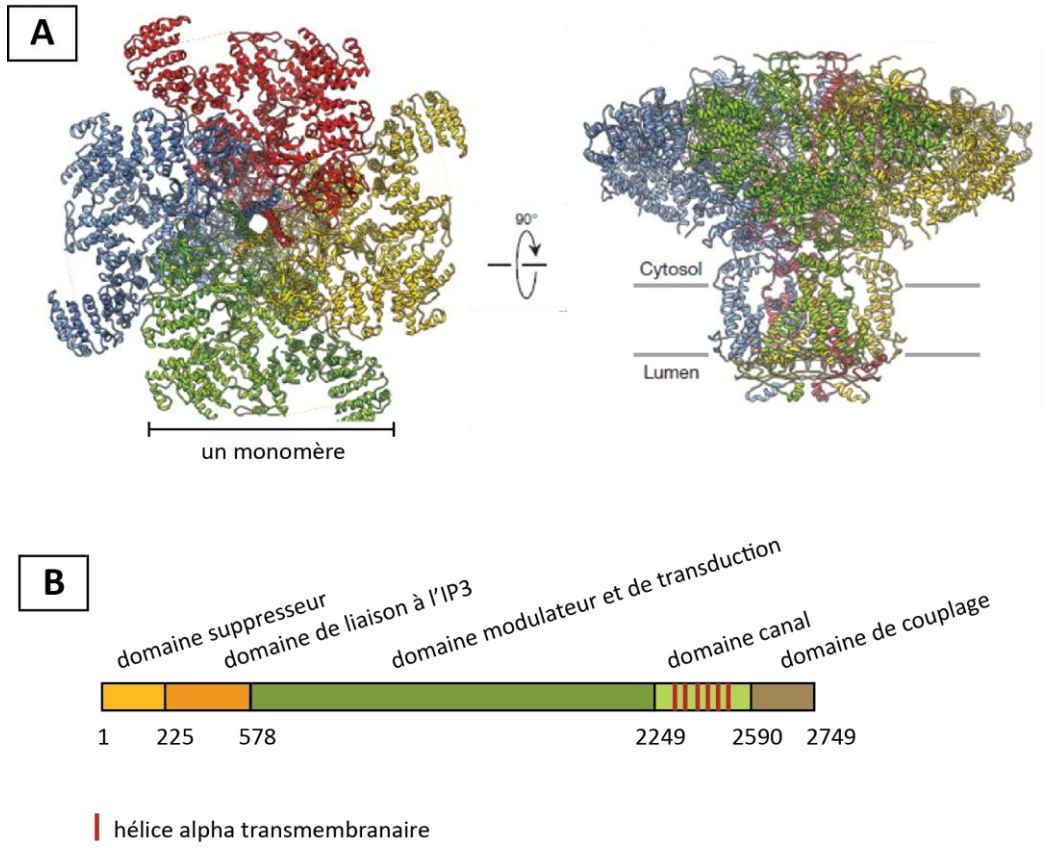


Figure 14: Structure et domaines du récepteur à l'IP3

***A** : Structure d'un tétramère d'IP3R. A gauche : vue de dessus, à droite : vue de profil. Structures issues de (Fan et al., 2015). **B** : Représentation schématique des domaines délimités au sein d'un monomère (IP3R1 de souris). Les chiffres indiquent la position des acides aminés.*

L'activité du récepteur à l'IP3 est modulée par de nombreuses protéines cellulaires. Certaines telles que RACK1 ou ankyrine se lient directement au domaine canal, régulant ainsi l'activité de transport des ions calcium. D'autres interagissent avec les régions N-terminales ou C-terminales (Mikoshiba, 2007). Parmi ces régulateurs, on trouve notamment les protéines de la famille Bcl-2.

La pompe SERCA

Au contraire de la sortie de calcium, l'entrée de calcium dans le réticulum endoplasmique nécessite la consommation d'énergie car il faut transporter les ions Ca^{2+} dans le sens contraire à leur gradient électro-chimique. Cette fonction est assurée par la pompe réticulaire SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) qui hydrolyse une molécule d'ATP pour importer deux ions Ca^{2+} (Krebs et al., 2015).

c) *Transport du calcium à la mitochondrie*

Les mitochondries sont le second réservoir calcique de la cellule, on estime la concentration calcique matricielle entre 100 et 800 nmol/L. Le calcium a une importance physiologique pour ces organites puisque trois enzymes matricielles sont activées par le calcium : la pyruvate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase et l'alpha-cétoglutarate déshydrogénase. Ces enzymes sont respectivement impliquées dans le métabolisme du pyruvate et le fonctionnement du cycle de Krebs. De ce fait, le calcium mitochondrial participe à la production d'ATP (Finkel et al., 2015). Certaines études dans les cardiomyocytes suggèrent également que le calcium régulerait directement l'ATP synthase (Territo et al., 2000). Si le calcium est un composant essentiel du métabolisme mitochondrial, un excès de calcium peut être délétère et provoquer la rupture de la membrane mitochondrial externe. La régulation des flux calciques mitochondriaux est donc un enjeu crucial pour la cellule.

Les mitochondries sont des organites bi-membranaires et l'entrée de calcium dans la mitochondrie se fait via un premier transporteur à la membrane externe (VDAC) et un second au niveau de la membrane interne (complexe MCU).

Le canal VDAC

VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) est la protéine la plus abondante de la membrane mitochondriale externe. Trois isoformes de VDAC ont été identifiés chez les Mammifères, notés VDAC1 à VDAC3. La structure de VDAC1 a été résolue en 2008 et comporte 19 brins béta antiparallèles formant un tonneau béta dont le premier et le dernier brin sont parallèles. Cette caractéristique est singulière par rapport aux tonneaux béta existant chez les bactéries qui comportent en général un nombre pair de brins. En plus du tonneau, la partie N-terminale forme une hélice alpha (Hiller et al., 2008). En conformation ouverte, le diamètre du canal est de 2,5 nm (**Figure 15**). De ce fait, le canal VDAC transporte des ions (Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{2+}…), des nucléotides (ATP, ADP, NADH) et des métabolites (pyruvate, malate, glutamate…) dont la taille peut aller jusqu'à 5kDa. VDAC permet à la fois l'entrée et la sortie de molécules de la mitochondrie. Par exemple, l'ADP entre dans la mitochondrie via VDAC alors que l'ATP nouvellement produit par la chaîne respiratoire sort de la mitochondrie en empruntant le même chemin (Shoshan-Barmatz et al., 2014).

La conductance du canal VDAC a été mesurée sur des canaux isolés dans des bicouches lipidiques. Il s'avère que la conductance dépend de la différence de potentiel (ddp) transmembranaire: lorsque la ddp est faible (-10mV à 10mV), le canal présente une plus grande conductivité (état ouvert), alors que sa conductivité est plus restreinte lorsque la ddp est élevée (état fermé) (Hodge and Colombini, 1997). A l'état ouvert, le canal transporte tous types de molécules mais conduit préférentiellement les anions

plutôt que les cations. A l'état fermé, le canal reste perméable aux petites molécules mais les molécules de taille plus importante telles que l'ATP ou l'ADP ne passent plus. En réalité, VDAC présente un continuum d'états entre l'état ouvert et l'état fermé, ce qui rend souvent difficile de discriminer l'état réel du canal dans les conditions expérimentales.

Des expériences de mesures de courant à travers des liposomes contenant VDAC et incubés dans une solution de $CaCl_2$ indiquent que VDAC est perméable aux ions Ca^{2+}. De plus, VDAC contient des sites de liaison au calcium (Gincel et al., 2001). Le calcium constitue également un régulateur de l'ouverture du canal VDAC. Ainsi, dans un système de liposomes contenant VDAC, la présence de calcium dans le milieu d'incubation provoque l'ouverture du canal VDAC. Le calcium présent dans le milieu augmente en particulier la conductance de VDAC pour les ions Ca^{2+}, et ce de façon réversible (Báthori et al., 2006). En conséquence, en présence de fortes concentrations calciques cytosoliques ou réticulaires, le canal VDAC s'ouvre et provoque un afflux de calcium dans la mitochondrie. VDAC participe donc au rôle tampon vis-à-vis du calcium exercé par la mitochondrie.

Par ailleurs, plusieurs études suggèrent que VDAC joue un rôle clé dans le transport de calcium entre le RE et la mitochondrie au niveau des sites de contact privilégiés entre ces deux organites. Ce phénomène sera explicité dans la partie d).

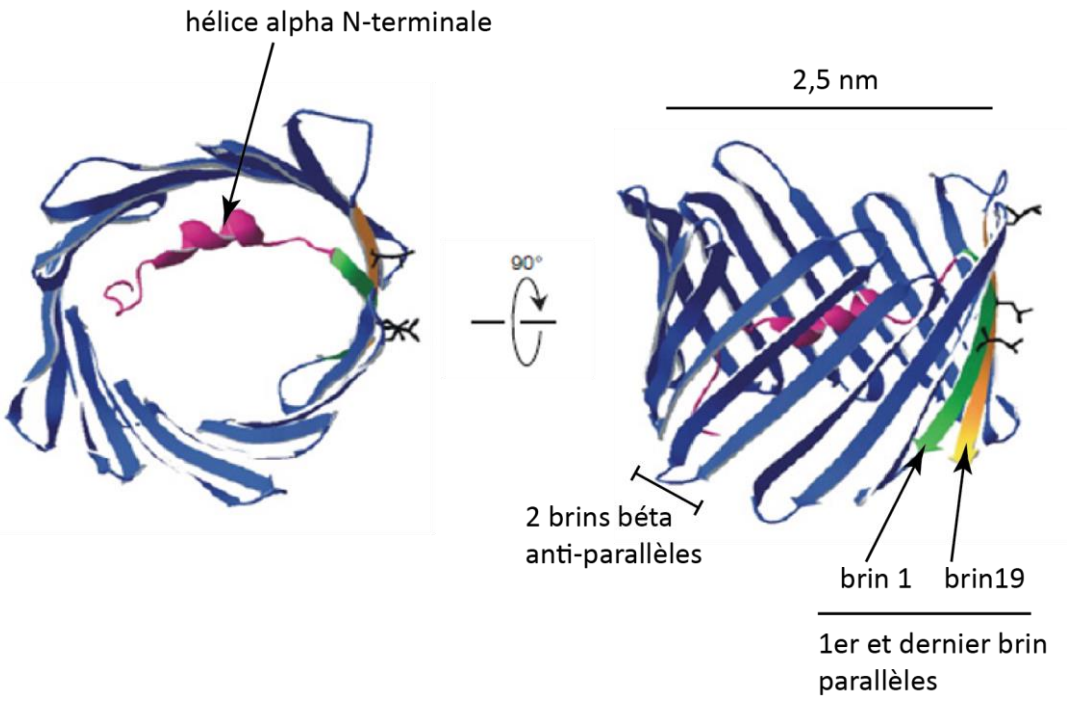


Figure 15: Structure du canal mitochondrial VDAC

A gauche : vue de dessus, à droite : vue de profil. L'hélice alpha N-terminale mobile se place à l'intérieur ou à l'extérieur du pore en forme de tonneau béta. Adapté de (Shoshan-Barmatz et al., 2014).

Le complexe MCU

Une fois présent dans l'espace intermembranaire, le calcium entre dans la matrice mitochondriale via un second système de transport, le complexe MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter). L'identité moléculaire de ce complexe n'a été élucidée que très récemment. MICU1 est le premier composant du complexe MCU à avoir été identifié, il s'agit d'un activateur de l'ouverture du canal MCU (Perocchi et al., 2010). Le canal MCU a lui été découvert par deux équipes en 2011 (Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011). Le canal s'assemble en tétramères et permet le passage du calcium depuis l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale.

L'échangeur NCLX

Le calcium stocké dans la mitochondrie est régulièrement remobilisé afin d'être transitoirement libéré dans le cytoplasme. De plus, un excès de calcium peut engendrer une mort cellulaire par apoptose. Ces deux constats soulignent l'importance des systèmes permettant la sortie du calcium mitochondrial. Au niveau de la membrane externe, le calcium sort de la mitochondrie via le canal VDAC. En revanche, le complexe MCU est seulement impliqué dans l'entrée de calcium dans la matrice. Sa sortie s'effectue grâce à un échangeur Na^+, Ca^{2+}, Li^+ (NCLX) qui expulse un ion Ca^{2+} de la matrice en échange de l'entrée de trois ions sodium. En effet, il existe un gradient de sodium au sein de la mitochondrie tel que la concentration en sodium matriciel est plus faible que celle de l'espace intermembranaire (Finkel et al., 2015).

d) Les MAM, zones privilégiées d'échanges de calcium entre le RE et la mitochondrie

Les MAM (Mitochondria Associated Membranes) sont des micro-domaines où RE et mitochondries sont en contact étroit. Au niveau des MAM, IP3R (en particulier IP3R3) forme un complexe avec VDAC1 par l'intermédiaire de la chaperone Grp75 qui interagit avec les deux canaux (Filadi et al., 2017). Le complexe permet la transmission presque directe du calcium réticulaire dans la mitochondrie. L'équipe de Rizzuto propose que l'activité de VDAC1 en tant que transporteur de calcium a lieu principalement au niveau des MAM et que ce canal est spécifiquement impliqué dans l'entrée des vagues calciques pro-apoptotiques de faible amplitude (De Stefani et al., 2012).

Les protéines de la famille Bcl-2 sont localisées à la mitochondrie mais également au RE, elles interagissent avec les canaux calciques de ces deux compartiments.

C. Régulation de l'homéostasie calcique par les protéines Bcl-2

1. Au niveau du Reticulum Endoplasmique

Le RE est l'espace majeur de stockage du calcium cellulaire, la quantité de calcium basale dans ce compartiment est donc finement régulée. La surexpression de Bcl-2 dans les cellules HeLa diminue la quantité de calcium stockée dans le RE. En effet, cette surexpression cause à la fois une diminution de l'entrée de calcium dans le RE et une augmentation de la fuite de calcium depuis le RE vers le cytosol ; les deux effets combinés réduisant la quantité de calcium stocké dans ce compartiment à l'état basal (Pinton et al., 2000). De façon intéressante, en surexprimant un mutant de Bcl-2 non-phosphorylable, le taux de calcium basal dans le RE est encore diminué par rapport aux cellules surexprimant la forme sauvage de Bcl-2 (Bassik et al., 2004). L'effet de Bcl-2 sur le contenu calcique du RE est donc en partie contrôlé par les modifications post-traductionnelles qui affectent Bcl-2. Cependant, dans d'autres systèmes expérimentaux, la surexpression de Bcl-2 n'a pas d'effet sur le contenu basal en calcium réticulaire (Hanson et al., 2008), ce qui indique le rôle de Bcl-2 sur le calcium dépend vraisemblablement du contexte cellulaire.

De façon symétrique, les MEFs double KO pour Bax et Bak voient leur contenu en calcium réticulaire diminué par rapport aux cellules contrôle. La surexpression de SERCA dans les KO corrige le phénomène (Scorrano et al., 2003).

a) Modulation du canal IP3R

Bcl-2 diminue la sortie de calcium réticulaire suite à une stimulation des cellules avec l'IP3 (**Figure 16**). En accord avec ces observations, Bcl-2 diminue la probabilité d'ouverture de IP3R en interagissant directement avec le canal, comme démontré par des expériences d'immunoprécipitation (Chen et al., 2004). D'autres études ont par la suite confirmé ces premières constatations, en soulignant l'importance de Bcl-2 dans les transferts de calcium du RE à la mitochondrie (Hanson et al., 2008).

Le domaine BH4 de Bcl-2 interagit avec IP3R au niveau du domaine modulateur, sur les acides aminés 1347 à 1426 (Rong et al., 2008, 2009). Des peptides dérivés de cette région de IP3R ou dérivés du BH4 de Bcl-2 peuvent rompre l'interaction entre ces deux protéines et provoquer l'ouverture du canal IP3R. Récemment, le domaine transmembranaire de Bcl-2 a aussi été décrit pour sa capacité à interagir avec le canal IP3R, alors que la poche hydrophobe de Bcl-2 n'aurait aucun contact avec IP3R (Ivanova et al., 2016). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'effet de Bcl-2 sur IP3R peut être découplée de celle des interactions de Bcl-2 avec les autres membres de la famille.

Bcl-xL interagit avec IP3R et module son activité mais selon des modalités différentes de Bcl-2 (**Figure 16**). En effet, Bcl-xL se lie au domaine de couplage de IP3R (domaine C-terminal) et sensibilise le canal aux faibles concentrations en IP3. Ainsi, alors que IP3R ne s'ouvre pas lorsqu'on applique une concentration en IP3 de 10nM, la surexpression de Bcl-xL provoque l'ouverture du canal à cette même concentration (White et al., 2005). De ce fait, contrairement à Bcl-2, Bcl-xL est un activateur de l'ouverture du canal IP3R. La même équipe a également montré dans une étude ultérieure que Bcl-xL interagit avec et module indifféremment les trois isoformes IP3R (Li et al., 2007).

L'équipe de Geert Bultynck a comparé les modalités d'interaction de Bcl-2 et Bcl-xL avec IP3R. Ainsi, les domaines de IP3R sur lesquels se fixent Bcl-2 et Bcl-xL ont été clonés et testés pour leur capacité à lier les protéines Bcl-2 et Bcl-xL totales purifiées. Dans ce système, Bcl-2 lie les deux domaines de IP3R avec la même affinité alors que Bcl-xL se lie préférentiellement au domaine C-terminal de IP3R (Monaco et al., 2012a). Cette première étude a donc révélé une sélectivité différente de Bcl-2 et Bcl-xL vis-à-vis de la liaison avec le récepteur à l'IP3. Dans un second temps, puisque Bcl-2 se lie à IP3R principalement grâce à son domaine BH4, le domaine BH4 de Bcl-xL a également été caractérisé pour sa capacité à interagir avec IP3R. De façon surprenante, alors que les deux domaines BH4 ont une séquence et une structure très proches, le domaine BH4 de Bcl-xL seul n'a pas d'effet sur IP3R alors que le domaine BH4 de Bcl-2 seul suffit à inhiber l'ouverture du canal. Les deux domaines diffèrent d'un seul acide aminé : la lysine 17 du BH4 de Bcl-2 est remplacée par une asparagine 11 sur Bcl-xL. Ce seul résidu explique la différence observée entre les deux domaines, puisque en remplaçant l'asparagine par la lysine dans le domaine BH4 de Bcl-xL ce dernier devient capable d'inhiber IP3R (Monaco et al., 2012b). En conclusion, le domaine BH4 de Bcl-xL n'a qu'une importance mineure dans l'interaction avec IP3R alors que le domaine BH4 de Bcl-2 joue un rôle de premier plan dans cette interaction. L'année dernière, l'équipe de Foskett a identifié le domaine de Bcl-xL responsable de l'interaction avec IP3R : il s'agit de la poche hydrophobe (Yang et al., 2016). Cette équipe propose que le domaine C-terminal de IP3R serait similaire à un domaine BH3. Ce modèle est supporté par le fait que Mcl-1 (et dans une moindre mesure Bcl-2) peuvent aussi lier IP3R au niveau de ce même domaine C-terminal et, tout comme Bcl-xL, sensibiliser IP3R aux faibles concentrations en IP3 (Eckenrode et al., 2010).

L'effet de Bcl-xL sur IP3R peut être contrecarré par d'autres partenaires. Ainsi, l'oncoprotéine K-Ras phosphorylée sur la sérine 181 lie Bcl-xL et le domaine C-terminal de IP3R in vitro. La formation de ce complexe perturbe l'homéostasie calcique de la cellule : K-Ras phosphorylé empêche l'action de Bcl-xL sur IP3R, limitant ainsi le transfert du calcium nécessaire au métabolisme mitochondrial (Sung et al., 2013). Enfin, la surexpression de Bcl-xL dans des lignées de cellules lymphoides diminue l'expression de IP3R1 et IP3R3 (Li et al., 2002), en absence d'apoptose.

Parmi les autres membres anti-apoptotiques de la famille, notre équipe a caractérisé les modalités d'interaction de Nrh et de Nrz, son orthologue chez le poisson zèbre, avec le récepteur à l'IP3. De façon similaire à Bcl-2, les domaines BH4 de Nrz et Nrh sont responsables de l'interaction avec le récepteur à l'IP3. En revanche, les deux protéines se fixent sur le domaine de liaison à l'IP3, ce qui constitue une caractéristique unique parmi les membres de la famille Bcl-2 (Bonneau et al., 2014; Nougarède et al, en préparation). En particulier, Nrz entre en compétition avec l'IP3 pour la liaison avec le récepteur IP3R. De cette manière, Nrz inhibe l'ouverture de IP3R. De façon similaire, Nrh est également un inhibiteur de IP3R et son activité est sous le contrôle d'un autre partenaire de IP3R, IRBIT (Bonneau et al., 2016).

Bok est, à ce jour, le seul membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 interagissant avec le récepteur à l'IP3. Le domaine BH4 de Bok se lie en effet au domaine modulateur de IP3R1 et IP3R2. Etonnamment, au contraire de ce qui a été décrit pour les anti-apoptotiques, la liaison de Bok sur IP3R n'a pas d'effet sur le transport de calcium médié par ce-dernier. En revanche, la formation du complexe Bok IP3R protège le canal de la dégradation protéolytique (Schulman et al., 2013). La conséquence de ce phénomène sur la physiologie des cellules reste encore à être évaluée.

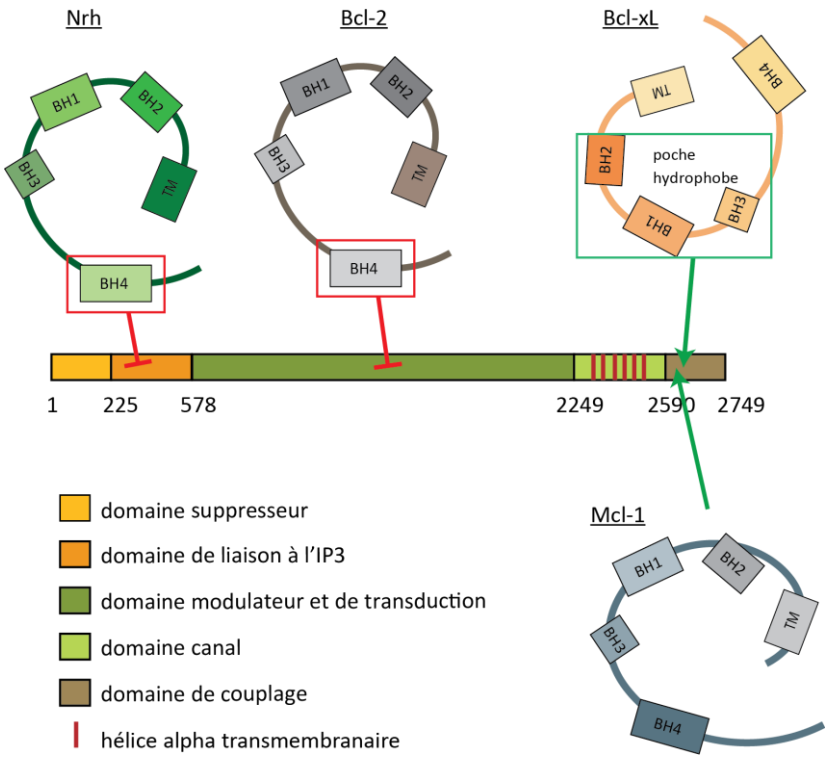


Figure 16: Interaction des protéines Bcl-2 anti-apoptotiques avec IP3R

Nrh et Bcl-2 sont principalement des inhibiteurs de IP3R, par interaction de leur domaine BH4 avec respectivement le domaine de liaison à l'IP3 et le domaine modulateur. Bcl-xL, Mcl-1 et dans une moindre mesure Bcl-2 (non représenté) activent le canal par interaction avec le domaine de couplage.

b) *Modulation d'autres systèmes de transport réticulaires*

La protéine BI1 (Bax Inhibitor 1) est impliquée dans le contrôle de l'homéostasie calcique réticulaire où elle exerce le rôle d'antiport H^+/Ca^{2+}. La surexpression de BI1 réduit le contenu basal en calcium réticulaire, comme le fait la surexpression de Bcl-2 dans certains systèmes expérimentaux. De plus, la surexpression de Bcl-xL ou Bcl-2 en absence de BI1 n'a plus d'effet sur le contenu basal en calcium, suggérant que BI1 agit en aval des protéines anti-apoptotiques (Xu et al., 2008). L'activité de transport de calcium exercé par BI1 a été par la suite évaluée dans des liposomes. Dans ce système, des peptides correspondants aux domaines BH4 de Bcl-xL et de Bcl-2 stimulent le transport ionique médié par BI1. Il semble donc que les protéines Bcl-2 et Bcl-xL modulent directement l'activité de ce transporteur (Ahn et al., 2010).

Plusieurs études détectent une interaction entre Bcl-2 et SERCA in vitro. Par contre, l'effet de cette interaction sur l'homéostasie calcique reste à préciser car Bcl-2 activerait l'activité de SERCA selon les uns, alors qu'elle l'inhibe selon les autres (Dremina et al., 2004; Kuo et al., 1998).

Les RyR comportent une séquence très proche de celle du site de liaison de Bcl-2 sur IP3R. En accord avec ce constat, une interaction entre RyR et Bcl-2 a été observée par immunoprécipitation des protéines recombinantes et endogènes. Bcl-2 peut se lier aux trois isoformes par l'intermédiaire de son domaine BH4. Le domaine BH4 seul suffit à inhiber la sortie de calcium de RyR. Au contraire de ce qui a été décrit pour IP3R, la lysine 17 du domaine BH4 n'a pas d'importance particulière pour l'interaction avec RyR puisqu'un domaine BH4 mutant pour cette lysine est toujours capable d'interagir et d'inhiber RyR (Vervliet et al., 2014). De la même manière, Bcl-xL interagit avec RyR3 et l'inhibe. Le domaine BH4 de Bcl-xL ainsi que la lysine 87 du domaine BH3 sont des déterminants de cette interaction (Vervliet et al., 2015).

2. Au niveau de la mitochondrie

a) *Modulation de VDAC*

Un des premiers liens établis entre la famille Bcl-2 et VDAC est l'observation qu'après retrait de facteurs de croissance (IL3), les cellules surexprimant Bcl-xL survivent parce qu'elles sont capables de maintenir les échanges ATP/ADP dans la mitochondrie (Vander Heiden et al., 1999). Or comme je l'ai précédemment évoqué, VDAC est en partie impliqué dans ce processus. Quelques mois plus tard, Shimizu et collègues mettent en évidence que Bcl-xL et VDAC interagissent et que Bcl-xL inhibe l'ouverture du canal. Au contraire, Bax et Bak stimulent l'ouverture du canal, permettant le passage du cytochrome c contenu dans des liposomes à travers VDAC (Shimizu et al., 1999). Cependant, les

travaux de Vander Heiden et collègues viennent nuancer ces observations. Si Bcl-xL est bien un régulateur de VDAC, les mesures de courant à travers VDAC purifié à partir de foie de rat et inséré dans des membranes phospholipidiques indiquent que Bcl-xL favorise l'ouverture de VDAC, et non sa fermeture comme décrit précédemment (Vander Heiden et al., 2001).

Une dizaine d'années plus tard, le lien entre Bcl-xL, VDAC et le transport du calcium mitochondrial est établi. Cependant là encore le sens dans lequel Bcl-xL régit les flux calciques via VDAC est débattu. L'équipe de Carl White observe que les MEFs KO pour Bcl-xL pompent moins de calcium à la mitochondrie que les cellules sauvages, après stimulation avec de l'ATP ou du calcium. De façon intéressante, le pompage de calcium est rétabli lorsque les MEFs KO sont complémentées avec Bcl-xL ciblé à la mitochondrie mais pas au RE. Dans cette étude, Bcl-xL favorise l'entrée de calcium mitochondrial via les canaux VDAC1 et VDAC3. Au contraire, Monaco et collègues observent que Bcl-xL a un effet inhibiteur sur l'entrée de calcium à la mitochondrie, toujours via la modulation de VDAC (Monaco et al., 2015). Bien que contradictoires, les deux effets décrits sont chacun justifiables. En tant que protéine anti-apoptotique, Bcl-xL promeut l'entrée de calcium nécessaire au fonctionnement du métabolisme mitochondrial. Il n'est pas pour autant illogique que Bcl-xL puisse aussi être un inhibiteur de l'entrée de calcium mitochondrial, étant donné que la surcharge calcique conduit à l'apoptose. En conclusion, Bcl-xL régule l'entrée de calcium à la mitochondrie via VDAC, mais le sens de cette régulation dépend vraisemblablement du contexte cellulaire et du système expérimental utilisé.

Les modalités de l'interaction de VDAC avec les protéines anti-apoptotiques sont en partie élucidées (**Figure 17**). Il semble que le domaine BH4 de Bcl-xL soit particulièrement important. En effet, Bcl-xL delta BH4 perd sa capacité à fermer VDAC. De façon surprenante et dans cette étude seulement, Bcl-xL delta BH4 interagit toujours avec VDAC, suggérant que le domaine BH4 a surtout une importance fonctionnelle. Enfin, des peptides dérivés des domaines BH4 de Bcl-2 et Bcl-xL inhibent l'ouverture de VDAC, dans un système où VDAC purifié est inséré dans des liposomes (Shimizu et al., 2000). Le rôle du domaine BH4 a été confirmé récemment. Le domaine BH4 de Bcl-xL utilisé sous forme de peptide inhibe les flux calciques médiés par VDAC. De façon intéressante, le domaine BH4 de Bcl-2 n'a presque pas d'effet sur VDAC, ce qui est à corréler avec une faible liaison du BH4 de Bcl-2 avec VDAC en biotin pull down (Monaco et al., 2015).

Les sites d'interaction de Bcl-2 et Bcl-xL sur VDAC1 ont été caractérisés par l'équipe de Shoshan Barmatz. Bcl-2 interagit avec la partie N-terminale de VDAC1 et au niveau des boucles L14-15 et L16-17 du tonneau béta. Des peptides dérivés de ces trois régions lient directement Bcl-2 et sensibilisent les cellules à l'apoptose (Arbel and Shoshan-Barmatz, 2010). Bcl-xL interagit avec VDAC au niveau de régions similaires et les peptides dérivés de VDAC se lient directement à Bcl-xL également (Arbel et al., 2012). A noter que dans ces deux dernières études, Bcl-2 et Bcl-xL contribuent à inhiber VDAC.

En 2014, une interaction entre Mcl-1 et VDAC1 ou VDAC3 est également observée. Cette interaction a pour effet l'ouverture du canal, avec en conséquence une augmentation de l'import de calcium et la formation accrue de ROS (Reactive Oxygen Species). En GST pull down, VDAC1 semble avoir une plus grande affinité pour Mcl-1 que pour Bcl-xL. De plus, les peptides N-terminaux et L14-15 dérivés de VDAC rompent l'interaction VADC1/Mcl-1. Mcl-1 se fixe donc sur les mêmes régions de VDAC1 que Bcl-2 ou Bcl-xL (Huang et al., 2014).

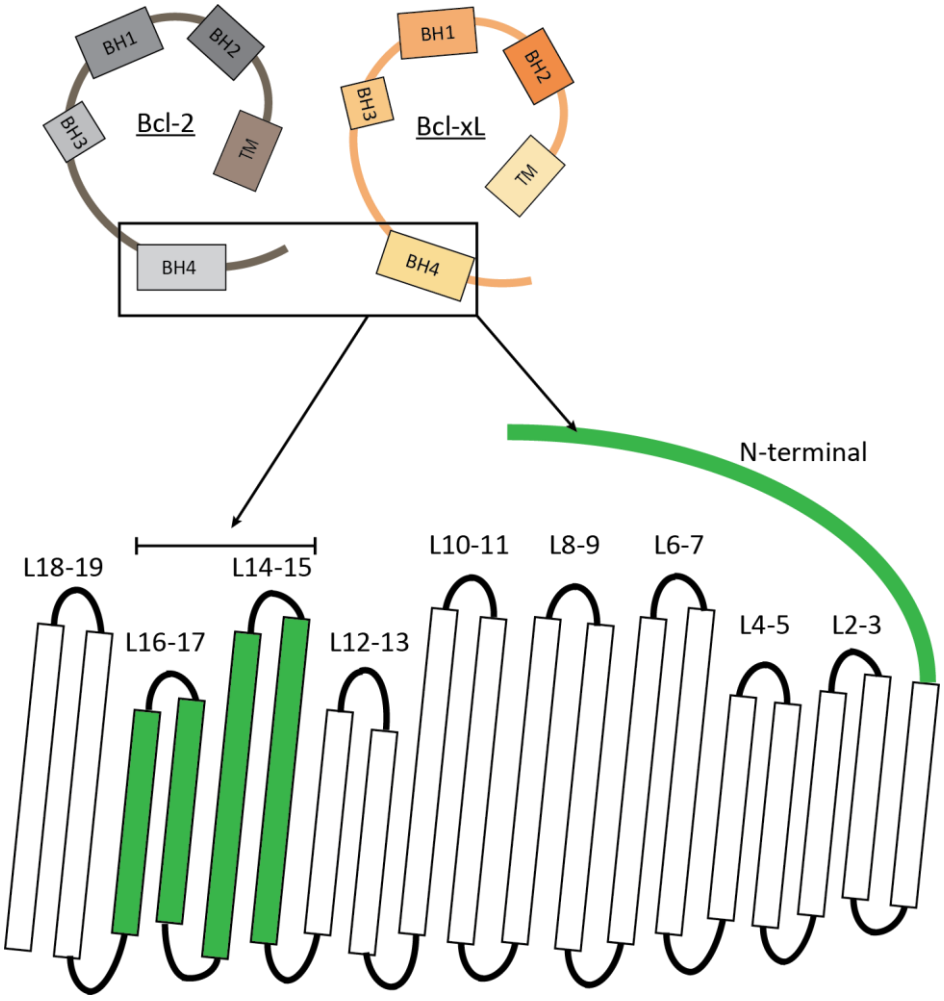


Figure 17: Interaction de Bcl-2 et Bcl-xL avec VDAC

VDAC est représenté en 2D, chaque rectangle représente un brin béta, le domaine N-terminal correspond à l'hélice alpha. Les régions d'interaction avec Bcl-2 et Bcl-xL sont surlignées en vert. L : loop.

b) Modulation de NCLX

A ce jour, une seule étude décrit un effet de Bcl-2 sur NCLX. Sur des mitochondries isolées à partir de tissu cardiaque de souris surexprimant Bcl-2, Bcl-2 inhibe l'activité de NCLX et donc la quantité de calcium matricielle est plus élevé que dans les mitochondries contrôle (Zhu et al., 2001). Néanmoins, des études dans d'autres systèmes seront nécessaires afin de valider cet effet.

Dans la seconde partie de mon introduction, j'ai montré que les protéines Bcl-2 présentent un grand nombre de fonctions non-canoniques, dont certaines sont potentiellement imputables aux effets de ces protéines sur l'homéostasie calcique cellulaire. Dans le contexte pathologique qu'est le cancer, nous allons voir que les protéines de la famille Bcl-2 contribuent à la survie des cellules cancéreuses mais qu'elles ont sûrement d'autres rôles dans le maintien et la progression de cette maladie.

III. Les Bcl-2 dans les cancers : entre apoptose et migration

A. Généralités sur les cancers

1. Modèle de la progression tumorale

Au sein d'un tissu, certaines cellules présentent des mutations génétiques. Si ces mutations confèrent un avantage sélectif (prolifération ou survie accrue, résistance à l'élimination par le système immunitaire etc), des clones de cellules mutées émergent et peuvent ensuite constituer une tumeur. Les cancers ont pour origine l'accumulation de cellules anormales formant une tumeur. La tumeur, en général bénigne au départ, grossit. A partir d'un certain stade, les cellules au sein de la tumeur entrent en compétition les unes avec les autres pour l'utilisation des ressources (oxygène, nutriments). Ainsi, les cellules au cœur de la tumeur se retrouvent souvent en hypoxie et entrent alors en nécrose. Face à cette pression de sélection, des cellules tumorales s'échappent de la tumeur et envahissent le stroma. Certaines d'entre elles atteignent les vaisseaux sanguins ou le système lymphatique. Elles sont alors transportées vers d'autres régions du corps, où elles peuvent s'installer et proliférer à nouveau, formant des tumeurs secondaires ou métastases. Le stade métastatique correspond généralement au stade le plus avancé de la maladie. Ce modèle de progression tumorale, depuis la formation d'une tumeur initiale jusqu'au développement de métastases, constitue la vue classique du mode de progression d'un cancer, bien que certaines tumeurs forment des métastases de façon parfois très précoce (Mehlen and Puisieux, 2006).

Dans le cas de notre modèle d'étude, le cancer du sein, une ou des tumeurs se forme au niveau de l'épithélium mammaire (**Figure 18**). Lorsque la tumeur devient agressive, des métastases s'établissent préférentiellement au niveau des ganglions lymphatiques proches du sein, des poumons ou encore des os. La phase métastatique est souvent une phase clé car la dissémination de métastases est associée à la mortalité des patientes. Ainsi, plus le cancer est détecté tôt, à un stade non métastatique ou avec une invasion locale, plus les chances de rémission sont élevées. Par ailleurs, il est crucial de comprendre les mécanismes de formation des métastases, de façon à cibler spécifiquement cette phase et diminuer le risque de rechute.

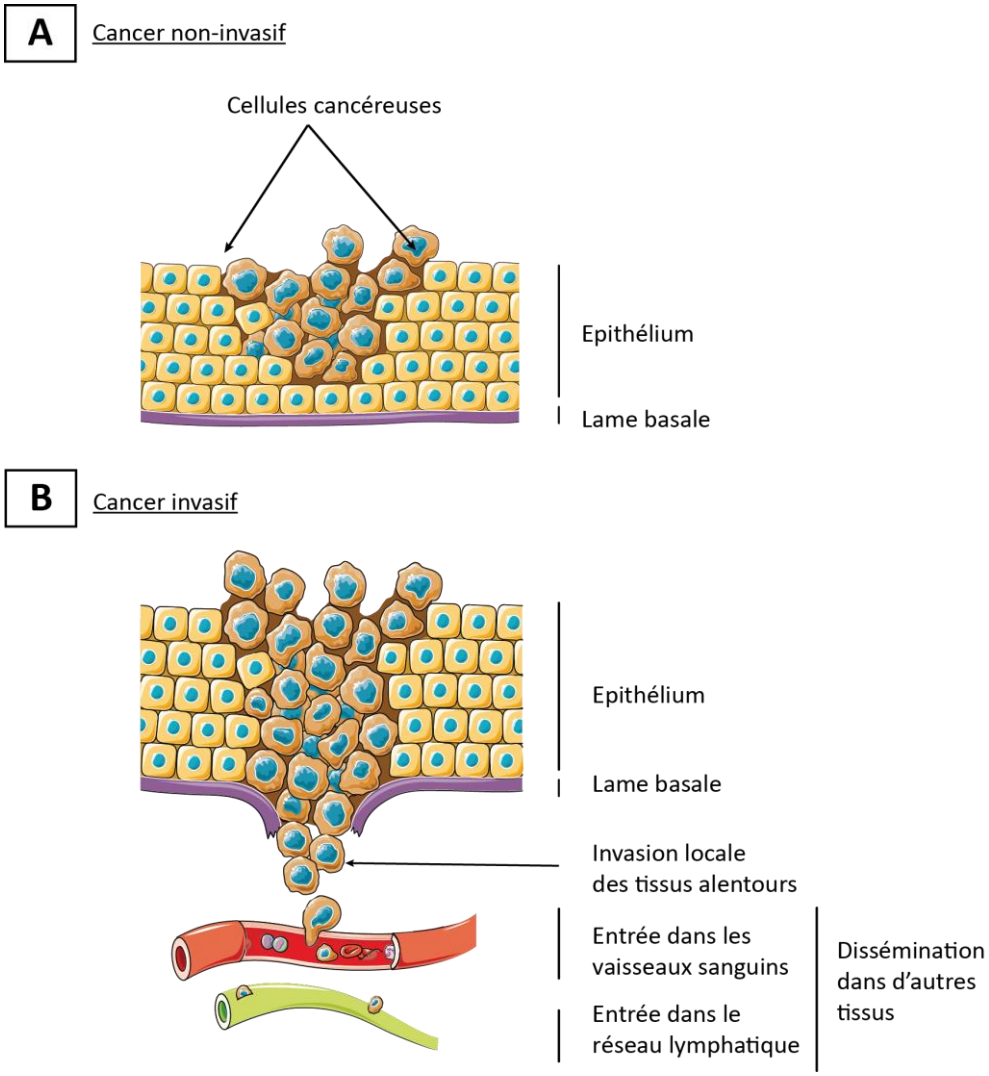


Figure 18: Vue simplifiée de la progression d'un cancer épithélial

***A** : Un clone de cellules cancéreuses émerge dans l'épithélium, formant une tumeur intra-épithéliale.*
***B** : La tumeur initiale est devenue invasive : certaines cellules ont traversé la barrière de la lame basale et envahissent le stroma alentour. Parmi les cellules invasives, un petit nombre entre dans les circulations sanguines et lymphatiques et est disséminé vers les autres organes. Si les cellules ainsi transportées sont en présence d'un environnement favorable dans un autre organe, elles peuvent envahir cet organe, proliférer et former des tumeurs secondaires ou métastases.*

Le pronostic d'un cancer du sein dépend aussi des marqueurs génétiques que la tumeur arbore. Les cancers du sein sont classés en sous-groupes déterminés par l'expression de marqueurs génétiques, tels que le récepteur aux œstrogènes, le récepteur à la progestérone ou le gène Erbb2. La classification en sous-type permet d'établir un pronostic et de proposer des traitements appropriés. Malgré les

outils cliniques existants, de nouveaux marqueurs et traitements ciblés sont nécessaires afin de proposer aux patientes une prise en charge la mieux adaptée possible.

La difficulté de traiter les cancers vient de l'hétérogénéité génétique des tumeurs. En effet, les cellules cancéreuses présentent fréquemment de nombreuses altérations génétiques qui leur confèrent des propriétés nouvelles.

2. Modifications génétiques associées aux cancers

Certains gènes jouent des rôles prépondérants dans la formation de cellules tumorales. Par exemple, le gène p53 est muté (inactivé) dans une majorité de tumeurs humaines. p53 muté ne peut plus déclencher l'apoptose en réponse à des dommages à l'ADN importants. Il s'agit d'un gène suppresseur de tumeur, puisque présent sous sa forme sauvage, il empêche la survie de cellules anormales.

Au contraire, les oncogènes sont surexprimés dans les tumeurs et leur expression est favorable au maintien de la tumeur. Au-delà de ces deux classes de gènes, il existe une très grande variabilité d'altérations génétiques répertoriées dans les cancers, et ce à toutes les échelles : variabilité liée au type de cancer, variabilité inter-individuelle et même variabilité intra-tumorale. Dans un souci de compréhension globale du phénomène, Hanahan et Weinberg ont proposé une classification des caractéristiques des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011). Parmi celles représentées sur la **Figure 19**, les gènes de la famille Bcl-2 interviennent dans la résistance à la mort cellulaire, le maintien de la prolifération et, comme je le montre au cours de ma thèse, l'acquisition de la capacité à envahir les tissus et former des métastases.

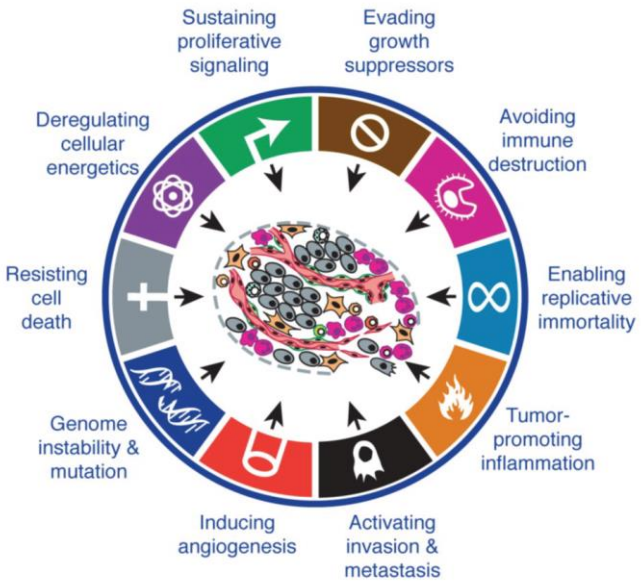


Figure 19: Caractéristiques des cellules cancéreuses définies dans (Hanahan and Weinberg, 2011)

B. Implication de la famille Bcl-2 dans les cancers et traitements associés

1. Implication des Bcl-2 dans les cancers

a) Altérations génétiques des Bcl-2 dans les cancers

Le gène *Bcl-2* a été identifié lors de l'étude d'un lymphome, ce qui laisse présager de l'importance de cette famille dans les cancers. En effet, les trois principaux anti-apoptotiques voient leur expression modifiée dans de nombreux cancers. En 2010, les altérations du nombre de copies de certains gènes ont été identifiées dans plus de 3000 échantillons de tissus cancéreux, comparés aux profils obtenus dans plus de 1000 tissus sains. De façon remarquable, les gènes de la famille Bcl-2 sont ceux dont le nombre de copies est le plus fréquemment altéré. Pour les anti-apoptotiques, *Bcl-x* et *Mcl-1* sont dupliqués dans 40% des échantillons analysés, en particulier dans les cancers du sein et du poumon (Beroukhim et al., 2010). *Bcl-2*, *Bcl-x* et *Mcl-1* peuvent également être surexprimés via d'autres mécanismes, telles que les translocations chromosomiques ou les mutations ponctuelles. De plus, les altérations d'expression des gènes Bcl-2 se retrouvent dans de nombreux types de cancers : lymphomes bien sûr mais également cancer du sein, du poumon ou du colon. Par ailleurs, l'expression des anti-apoptotiques dans les cancers est régulée par des microARN : les micro-ARN induisent l'apoptose dans les cellules en ciblant l'ARNm des anti-apoptotiques, empêchant ainsi leur expression (Cimmino et al., 2005; Denoyelle et al., 2014; Nakano et al., 2010).

Si les altérations d'expression des anti-apoptotiques suggèrent qu'ils ont un rôle dans la formation de tumeurs, seuls les modèles murins de tumorigénèse ont permis d'établir formellement le rôle pro-tumorigénique des anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Pour cela, des modèles surexprimant de façon concomitante l'oncogène *myc* et l'oncogène putatif *Bcl-2* ont été générés. Dans ces conditions, les souris développent des lymphomes B dont elles succombent au bout de 7 semaines. Le développement tumoral est deux fois plus rapide que pour les souris surexprimant uniquement l'oncogène *myc* (Strasser et al., 1990). *Myc* et *Bcl-2* agissent dans ce modèle de façon synergique, en accélérant la formation de tumeurs. Les mêmes résultats ont été obtenus avec *Bcl-x* (Swanson et al., 2004). Ce type d'étude a contribué à classer les anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans la catégorie des oncogènes.

Au contraire, certains membres pro-apoptotiques de la famille voient leur expression diminuée dans les cancers. Dans l'étude des altérations du nombre de copies publiée en 2010, les gènes *Puma* et *Bok* subissent des délétions dans 15% des échantillons. *Puma*, *Bid* et *Bax* sont fréquemment sous-exprimés dans les cancers du colon (Rupnarain et al., 2004). Des altérations de l'expression de *Bim* sont

observées dans certains cancers hématologiques (Delbridge and Strasser, 2015). Les mécanismes d'altération d'expression des Bcl-2 sont résumés dans la **Figure 20**.

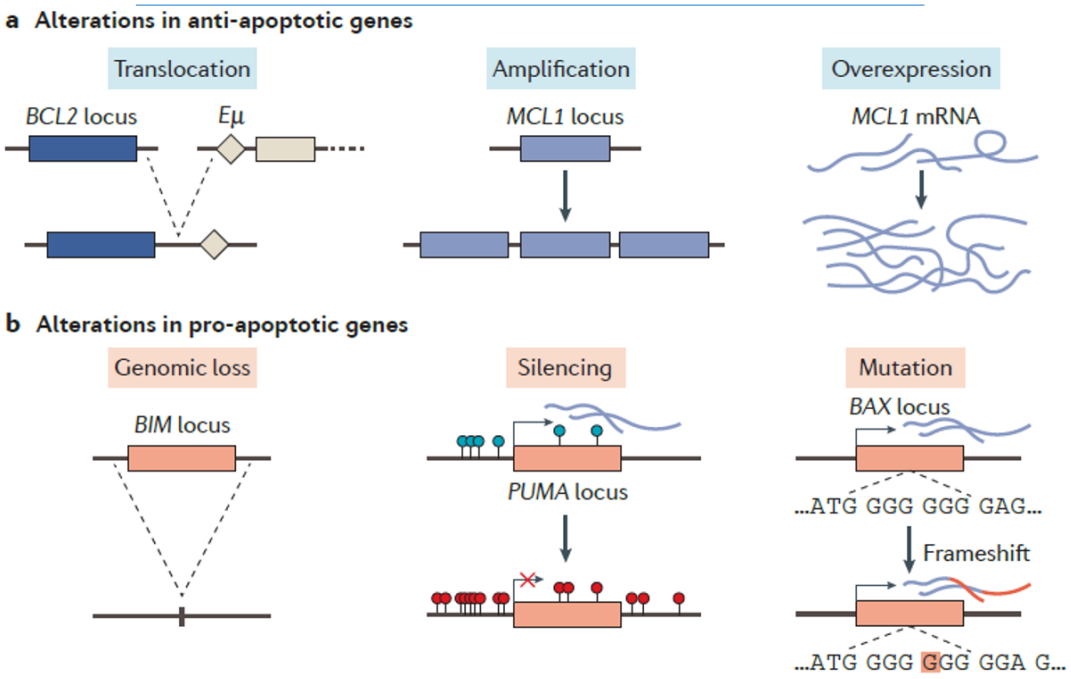


Figure 20: Altérations génétiques affectant les gènes de la famille Bcl-2 dans les cancers

***a** : Les gènes anti-apoptotiques voient leur expression augmentée dans les cellules cancéreuses par translocation chromosomique, duplication de gènes ou surexpression. **b** : Au contraire, les gènes pro-apoptotiques sont sous-exprimés dans les cellules cancéreuses par perte du gène, inhibition épigénétique de l'expression du gène ou mutation ponctuelle faux-sens ou non-sens. Figure extraite de (Delbridge et al., 2016).*

b) Les gènes Bcl-2 : des marqueurs cliniques ?

Les cancers du sein sont classés en sous-types basés sur l'expression de marqueurs génétiques. Les sous-types sont définis selon la signature génétique PAM50, où l'expression de 50 gènes définit cinq principaux sous-types. *Bcl-2* est un des gènes de la signature PAM50 et un marqueur du sous-type luminal B (Parker et al., 2009).

De façon paradoxale, *Bcl-2* est un marqueur de bon pronostic lorsqu'il est détecté dans les cancers du sein de bas grade exprimant le récepteur aux œstrogènes ou à la progestérone (Hwang et al., 2012). Ce constat peut être expliqué ainsi : les tumeurs mammaires exprimant Bcl-2 seraient amorcées à mourir (voir partie suivante) et donc potentiellement plus sensibles aux chimiothérapies.

En revanche, dans les cancers du sein triple négatifs ou de haut grade, l'expression de Bcl-2 corrèle avec un pronostique défavorable (Bouchalova et al., 2015).

c) *Les Bcl-2 anti-apoptotiques et la résistance aux chimiothérapies*

Les anti-apoptotiques de la famille contribuent à la résistance des tumeurs aux chimiothérapies. En particulier, la stabilisation accrue de Mcl-1 constitue un important mécanisme de résistance aux chimiothérapies (Tong et al., 2017). Autre exemple, la résistance au HD201, agent inhibant l'interaction p53/MDM2, dans un modèle d'oncogenèse murine est, de façon remarquable, médiée par surexpression de Bcl-xL dans 40% des tumeurs analysées ; mettant ainsi en évidence l'importance de ce gène dans la réponse à ce type de traitement (Chapeau et al., 2017).

Pour ces raisons, il est très vite apparu qu'inhiber l'expression de ces gènes ou l'activité des protéines qu'ils encodent pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante.

2. Les BH3-mimétiques, de nouveaux outils pour soigner certains cancers

Quatre critères permettant de considérer des molécules comme des inhibiteurs des Bcl-2 anti-apoptotiques ont été définis par Lessene et collègues (Lessene et al., 2008). (1) Les composés doivent induire l'apoptose de façon Bax/Bak dépendante. (2) Les composés ont une affinité pour au moins l'un des membres anti-apoptotiques de la famille de l'ordre du nanomolaire. (3) Leur effet cytotoxique est corrélé aux niveaux d'expression des anti-apoptotiques dans les cellules ciblées. (4) Les inhibiteurs doivent présenter des effets tangibles dans les modèles animaux, par exemple un inhibiteur de Bcl-xL doit diminuer le nombre de plaquettes.
En scrutant les banques de molécules à la recherche d'inhibiteurs des Bcl-2 anti-apoptotiques, on s'est aperçu que les molécules les plus efficaces étaient capables de lier les anti-apoptotiques au niveau de leur poche hydrophobe, mimant la liaison du domaine BH3 des pro-apoptotiques dans cette poche. Ce type d'inhibiteur est ainsi nommé BH3-mimétique.

a) *Quelques exemples de BH3-mimétiques*

Inhibiteurs de plusieurs anti-apoptotiques

Les premiers inhibiteurs ont été obtenus par exploration de banques de molécules existantes alors que les inhibiteurs ultérieurs ont été synthétisés *de novo*. Parmi les inhibiteurs présents dans les banques de molécules, l'obatoclax (GX15-070) est un antagoniste de tous les anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 alors que le gossypol (extrait des graines de coton) cible Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xL. Ces deux composés utilisés en combinaison avec d'autres chimiothérapies sont en essai clinique de phase I et II. Cependant, les premiers résultats sont assez décevants car, s'ils sont bien tolérés, les composés ne présentent pas d'effet probant sur les patients (Langer et al., 2014; Schimmer et al., 2014; Stein et al., 2016).

L'ABT737 a été synthétisé par amélioration d'un peptide dérivé de Bad (**Figure 21**). L'ABT 737 est un antagoniste de Bcl-w, Bcl-2 et Bcl-xL avec un Ki inférieur à 1nM ; il est en revanche moins efficace contre Mcl-1, Bfl-1 et Nrh. Il induit l'apoptose de lignées cellulaires immortalisées, de cellules cancéreuses lymphoides dérivées de patients mais est aussi actif dans un modèle de xénogreffes de cancer du poumon à petites cellules. Il peut être utilisé seul ou en combinaison avec d'autres traitements, selon le type de cancer ciblé (Oltersdorf et al., 2005).

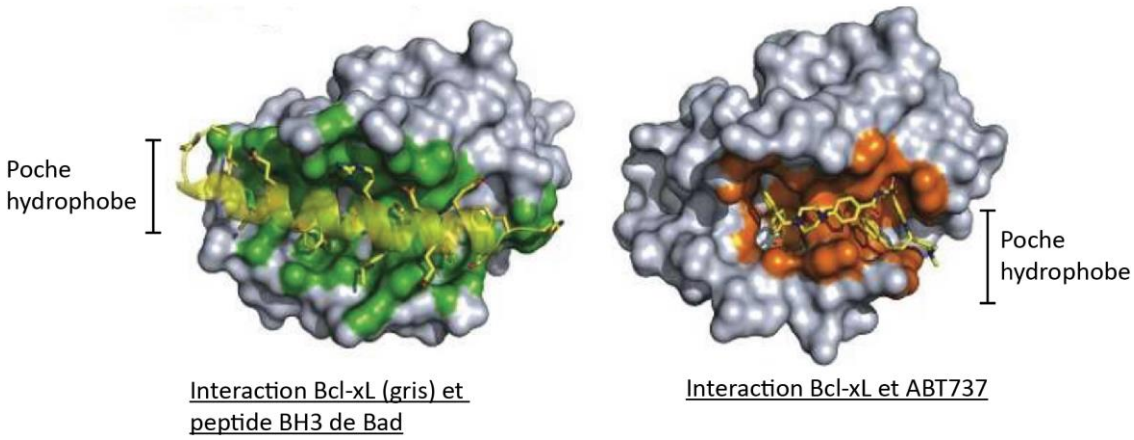


Figure 21: Comparaison de l'interaction Bcl-xL/Bad et de l'interaction Bcl-xL/ABT737

Sur le schéma de gauche, la région de la poche hydrophobe de Bcl-xL interagissant avec le peptide BH3 de Bad est colorée en vert. Sur le schéma de droite, les acides aminés de Bcl-xL représentés en orange sont ceux qui interagissent avec l'ABT737. Adapté de (Wells and McClendon, 2007).

Un composé équivalant à l'ABT737 mais bio-disponible par voie orale a été par la suite synthétisé : il s'agit de l'ABT263 ou navitoclax (Tse et al., 2008). Le navitoclax est utilisé dans de nombreux essais cliniques de phase I ou II, seul ou en combinaison, sur des tumeurs sanguines ou solides. Cependant, les premiers résultats de ces essais révèlent que si le composé contribue bien à réduire le volume tumoral, il a des effets secondaires non négligeables (Gandhi et al., 2011). En particulier, il provoque une thrombocytopénie liée à son activité inhibitrice de Bcl-xL, facteur indispensable à la survie des plaquettes (cf I.C.1). Les essais cliniques ont donc pointé du doigt la nécessité de développer des inhibiteurs plus spécifiques des anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Juin et al., 2013).

Inhibiteurs spécifiques

Poursuivant ce nouvel objectif de spécificité, l'ABT199 ou venetoclax, inhibiteur de Bcl-2 exclusivement, a été récemment mis au point. L'ABT199 administré à une série patients présentant des cancers hématologiques, cause la régression des tumeurs sans induire de thrombocytopénie (Souers et al., 2013). L'ABT199 est actuellement en essai clinique de phase III pour de nombreux cancers hématologiques, administré seul ou en combinaison. L'ABT199 a fait l'objet d'une autorisation de mise sur le marché par la FDA américaine en 2016, pour une utilisation auprès de patients atteints de leucémie lymphoide chronique comportant une délétion 17p et ayant déjà reçu une chimiothérapie. En France, le venetoclax est sous le contrôle d'une Autorisation Temporaire d'Utilisation, l'Autorisation de Mise sur le Marché n'ayant pas encore été validée. Parallèlement, un autre composé spécifique de Bcl-2, le S55746, est également utilisé pour des essais de phase I (Ashkenazi et al., 2017).

De la même manière, des inhibiteurs spécifiques de Bcl-xL tels que le wehi539 ont été synthétisés et sont en cours d'amélioration (Lessene et al., 2013; Leverson et al., 2015).

Mcl-1, qui est surexprimé dans de nombreux cancers, constitue une autre cible de choix. Le dérivé du gossypol TW37 est un inhibiteur controversé de Mcl-1 (Varadarajan et al., 2013). Plus récemment, le composé S63845 se lie spécifiquement à Mcl-1 à des doses de l'ordre du nanomolaire et induit la régression de tumeurs xénogreffées issues de plusieurs types de cancers hématologiques (Kotschy et al., 2016).

L'importance de produire des inhibiteurs spécifiques des Bcl-2 s'est accrue suite à la découverte de l'addiction des cellules cancéreuses aux anti-apoptotiques.

b) Concept de l'addiction aux anti-apoptotiques et son application : le profilage BH3

Les jalons de ce modèle ont été posés par l'équipe d'Anthony Letai dans des travaux parus en 2006. Les auteurs y traitent des cellules avec des peptides BH3 synthétiques correspondant aux différents BH3-only et mesurent la capacité des peptides à induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. En corrélant les données obtenues aux profils de liaison des BH3-only aux anti-apoptotiques, on peut déduire de quel anti-apoptotique les cellules cancéreuses dépendent pour leur survie. Par exemple, des cellules qui meurent par traitement avec le BH3 de Bad, Bid, Puma ou Bmf mais pas avec le BH3 de Noxa ou Hrk sont principalement dépendantes de Bcl-2 pour leur survie (Certo et al., 2006).

Les cellules qui dépendent des anti-apoptotiques pour leur survie sont dites amorcées à mourir ou « primed to die ». En effet, ces cellules survivent aux signaux apoptotiques en les compensant par une surexpression des protéines Bcl-2 anti-apoptotiques. Si on entrave les anti-apoptotiques surexprimés en utilisant des BH3-mimétiques, on déplace l'équilibre en faveur de la libération des protéines à BH3-only endogènes, provoquant l'apoptose des cellules traitées (Lopez and Tait, 2015 et **Figure 22**).
En conséquence, on peut déterminer in vitro en utilisant les différents peptides BH3 quelles cellules tumorales seront d'une part potentiellement sensibles aux traitements par BH3-mimétiques et d'autre part, à quelle protéine anti-apoptotiques elles doivent leur survie (Deng et al., 2007). Cette technique est celle du profilage BH3.

Récemment, le profilage BH3 a été développé à grande échelle et utilisé comme outil prédictif de sensibilité aux chimiothérapies. L'augmentation du priming mitochondrial (déterminé avec un peptide BH3 de Bim) en réponse à une chimiothérapie permet en effet de prédire la sensibilité des cellules cancéreuses à cette chimiothérapie, et *in fine* l'efficacité de réponse chez le patient. Cette technique montre des résultats prometteurs sur lignées cellulaires (poumon, sein, mélanome et lignées hématologiques) mais également sur échantillons de patients atteints de leucémie (Montero et al., 2015). La preuve de concept ayant été établie, le profilage BH3 pourra être effectué in vitro sur des biopsies et contribuer au choix du meilleur traitement en amont.

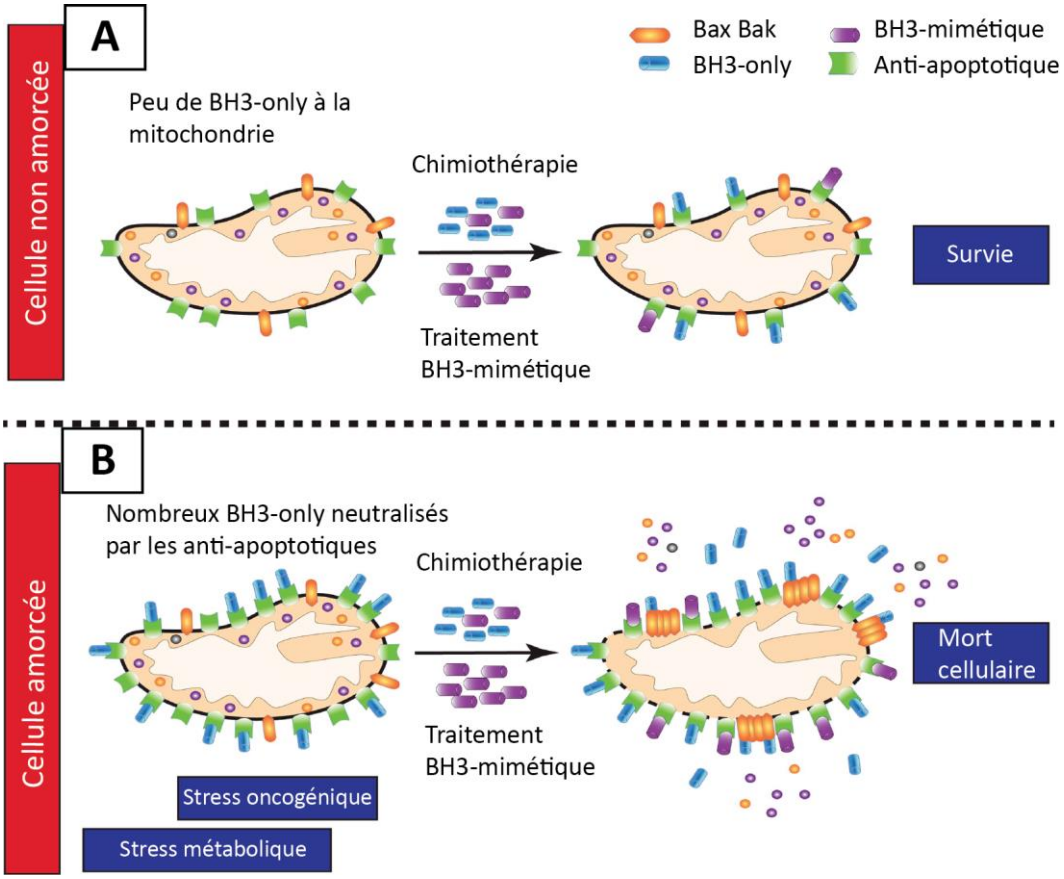


Figure 22: Concept du "priming" mitochondrial

***A** : Les cellules non amorcées expriment peu de BH3-only endogènes et répondent moins bien aux traitements par BH3-mimétiques. **B** : Les cellules amorcées à mourir répondent aux stress (par exemple stress oncogénique ou métabolique) en neutralisant l'activité des BH3-only par surexpression des anti-apoptotiques. Lors d'un traitement par BH3-mimétique, l'équilibre est déplacé en faveur de l'excès de BH3-only endogène, conduisant à la mort des cellules par apoptose. Figure adaptée de (Lopez and Tait, 2015).*

c) Efficacité et résistance aux BH3-mimétiques

L'étude des effets des BH3-mimétiques sur plusieurs types de cancers indique qu'il est pertinent de disposer de méthodes de prédiction de leur efficacité. Par exemple, seules les cellules de lymphomes surexprimant Bcl-2 mais pas celles surexprimant Bcl-xL ou Bcl-w sont sensibles au traitement par l'ABT737, alors même que ce composé cible les trois anti-apoptotiques avec une affinité similaire (Mérino et al., 2012). De la même façon, l'efficacité du wehi539 ciblant spécifiquement Bcl-xL dépend du taux d'expression de cette protéine mais également du partenaire pro-apoptotique auquel elle est

liée. Notamment, le wehi539 est efficace pour dissocier l'interaction Bax/Bcl-xL mais pas l'interaction Puma/Bcl-xL ou Bim/Bcl-xL, ce qui explique l'efficacité partielle du wehi539 sur certaines cellules (Pécot et al., 2016).

Il se révèle crucial dans ce contexte de connaître le taux d'expression des anti-apoptotiques, de façon à minimiser la résistance aux traitements par BH3-mimétiques. Par exemple, l'acquisition d'une résistance au traitement avec l'ABT737 se traduit souvent par une stabilisation de l'expression de Mcl-1. Une stratégie pour limiter cette résistance est donc de cibler spécifiquement Mcl-1. De façon intéressante, l'expression de Mcl-1 dans les lignées cellulaires de lymphomes est dépendante du fonctionnement de la glycolyse, puisque l'utilisation d'inhibiteurs de la glycolyse (tel que le 2-DéoxyGlucose) diminue l'expression de Mcl-1 dans les cellules. En conséquence, le traitement des cellules avec du 2-DG accroit la sensibilité des cellules à l'ABT737 (Meynet et al., 2012). Afin d'exploiter cette propriété in vivo, des souris injectées avec des cellules de lymphome Eμ-myc ont été soumises à un régime de restriction calorique (réduction de 25% de la dose quotidienne de nourriture). Les souris soumises au régime restrictif développent des lymphomes dans lesquels l'expression de Mcl-1 est réduite par rapport aux lymphomes des souris contrôle. De plus, la restriction calorique sensibilise les lymphomes à l'ABT737 ce qui améliore la survie des souris en restriction calorique par rapport aux souris contrôle non traitées (Meynet et al., 2013). Par ailleurs l'effet de la restriction calorique sur Mcl-1 est indépendant de p53 ou des BH3-only Bim, Puma ou Noxa, suggérant que dans ce contexte l'expression de Mcl-1 dépend directement du métabolisme. Afin de connaître quels nutriments contrôlent l'expression de Mcl-1, les souris injectées avec des cellules de lymphome Eμ-myc ont été soumises à des régimes pauvres en glucides ou en protéines. Les lymphomes des souris privées de glucides ont une plus faible expression de Mcl-1 par rapport aux souris à régime classique, ce qui n'est pas le cas pour les souris privées en protéines (Rubio-Patiño et al., 2016). Ainsi, la résistance aux BH3-mimétiques médiée par Mcl-1 peut être en partie contrecarrée par une modification du métabolisme.

3. D'autres façons de cibler les Bcl-2 anti-apoptotiques

a) Peptides antagonistes ciblant l'interaction IP3R/ Bcl-2

Bcl-2, tout comme Mcl-1 et Bcl-xL, interagit avec le récepteur à l'IP3 au niveau du réticulum endoplasmique où il empêche les flux calciques pro-apoptotiques du RE vers le cytosol ou la mitochondrie. L'équipe de Clark Distelhorst propose de rompre cette interaction en utilisant des peptides inhibiteurs. Le peptide utilisé correspond à une région de 20 acides aminés de IP3R où Bcl-2 interagit. Le peptide entre en compétition avec IP3R pour lier Bcl-2, rendant les cellules plus sensibles à l'apoptose calcium dépendante (Rong et al., 2008). Une fois fusionné à une séquence TAT, le peptide

dans sa forme la plus efficace (BIRD2) est délivré plus facilement aux cellules et tue des cellules de cancers hématologiques (Lavik et al., 2015; Zhong et al., 2011). Il est également efficace contre des lignées cellulaires de cancer du poumon (Greenberg et al., 2015). De façon intéressante, le peptide BIRD2 peut être combiné avec l'ABT263 et montre un effet synergique. Ainsi, de tels peptides pourraient être utilisés en complément des BH3-mimétiques et limiter l'émergence de résistances aux traitements.

b) Molécules ciblant le domaine BH4

Dans la même optique, des antagonistes du domaine BH4 ont été récemment synthétisés. En effet, le domaine BH4 des anti-apoptotiques contribue lui-aussi à réguler la survie des cellules, puisque les anti-apoptotiques delta BH4 deviennent pro-apoptotiques (Fujita et al., 1998). Han et collègues ont développé une molécule ciblant spécifiquement le domaine BH4 de Bcl-2, le BDA366 (Han et al., 2015). La liaison entre le BDA366 et Bcl-2 provoque un changement de conformation de Bcl-2, rendant la protéine capable d'activer Bax. Par conséquent, le complexe BDA366/BCl-2 se comporte comme Bcl-2 delta BH4. Le BDA366 réduit le volume de tumeurs pulmonaires humaines xénogreffées chez la souris. Il peut être utilisé seul ou en combinaison avec d'autres chimiothérapies. Le domaine BH4 étant celui qui régule l'interaction de Bcl-2 avec IP3R, le BDA366 entre en compétition avec IP3R pour lier Bcl-2 ; ce qui fait que ce composé pourrait à lui seul contrecarrer les deux voies majeures par lesquelles Bcl-2 exerce un effet anti-apoptotique.

Dans notre équipe, nous avons également créé un peptide à partir du domaine BH4 de Nrh et ce composé sensibilise les cellules tumorales mammaires aux chimiothérapies. Le peptide se lie directement à Nrh, empêchant ainsi son interaction pro-survie avec le récepteur à l'IP3 (Nougarède et al, en préparation).

4. Au-delà de l'apoptose : rôle des Bcl-2 dans la progression tumorale ?

Je présente ici une partie des études consacrées au rôle des Bcl-2 dans la progression tumorale, en particulier ce qui a été publié sur Bcl-2 ou Mcl-1. Je reviendrai plus précisément sur les données relatives à Bcl-xL dans l'introduction de mon sujet de thèse.

Un peu plus de dix ans après la découverte de Bcl-2, des données dans des lignées cellulaires de gliomes ont suggéré que ce gène pourrait avoir un rôle dans la progression tumorale. En effet, lorsqu'on surexprime Bcl-2, les cellules migrent davantage et montrent des capacités d'invasion

accrues dans des modèles de chambre de Boyden avec matrigel ou de sphéroides enveloppées dans du matrigel (Wick et al., 1998). De plus, l'expression et l'activité des métalloprotéinases matricielles sont augmentées dans les lignées surexprimant Bcl-2. Les mêmes types d'observations ont été faites pour Bcl-xL à cette époque, sans pour autant impacter l'idée que le rôle prépondérant des Bcl-2 dans les cancers est celui du contrôle de l'apoptose.

Depuis les années 2010, de plus en plus d'études relient les protéines Bcl-2 à la capacité migratoire des cellules (Koehler et al., 2013, 2014). Cependant, le mécanisme sous-jacent reste largement controversé. En effet, la surexpression de Bcl-2 induit une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) dans certains modèles (An et al., 2015; Zuo et al., 2010). Bcl-2 interagit avec Twist1, un régulateur de l'EMT et cette interaction augmente la migration des cellules de cancers oraux, dans un mécanisme EMT-dépendant (Duan et al., 2016). Dans d'autres cas, l'effet de Bcl-2 sur la migration cellulaire est dû la modification du taux de polymérisation de l'actine dans les cellules (Ke et al., 2010). Cependant, cette dernière étude stipule que Bcl-2 est un inhibiteur de la migration cellulaire, ce qui va à l'encontre des données publiées par la suite.

Mcl-1 contrôle la migration et l'invasion cellulaire dans plusieurs modèles (Huang et al., 2014; Young et al., 2016).

Par ailleurs, un groupe coréen a étudié de façon extensive le rôle de Bcl-w dans la migration des cellules cancéreuses gastriques (Bae et al., 2006). Bcl-w promeut ainsi la migration par modulation de l'expression de MMP2 et de FAK. De plus, Bcl-w active FAK par phosphorylation (Bae et al., 2009). En amont des deux effecteurs précédents, la voie de réponse au récepteur à l'EGF et la protéine Src régulent la migration sous le contrôle de Bcl-w (Kim et al., 2015).

Le rôle des protéines pro-apoptotiques dans la migration cellulaire et la progression tumorale reste peu élucidé. Quelques rares études sur le sujet commencent à émerger. Par exemple, Bad est sous-exprimé dans les tumeurs mammaires et contribue à réduire la capacité migratoire des cellules (Cekanova et al., 2015).

L'ensemble des données sur les Bcl-2 et la migration des cellules cancéreuses pointe l'importance de cette famille au-delà de l'apoptose et la complexité de ses effets sur les cellules, en particulier cancéreuses (Um, 2016).

C. La migration cellulaire, propriété clé de la progression tumorale

Parmi les caractéristiques des cellules cancéreuses définies par Hanahan et Weinberg, l'acquisition d'un phénotype migratoire et invasif constitue une étape cruciale dans la progression tumorale. On parle de migration cellulaire lorsque la motilité des cellules est évaluée dans un contexte à deux dimensions, alors que l'invasion cellulaire désigne la capacité des cellules à se déplacer dans un environnement en trois dimensions. *In vivo*, les cellules cancéreuses envahissent le stroma de façon tridimensionnelle, cependant, les modèles de migration *in vitro* en deux dimensions ont permis de modéliser les caractéristiques moléculaires des cellules en migration (Kramer et al., 2013).

1. Modes de migration des cellules cancéreuses

a) Généralités

Plusieurs types de phénotypes migratoires ont été répertoriés. Les cellules cancéreuses peuvent migrer de façon individuelle. Dans ce cas, les cellules disjointes envahissent le stroma en se déplaçant selon deux modes principaux : le mode amiboïde et le mode mésenchymateux. Le mode amiboïde fait référence à la migration des amibes et est caractérisé soit par des cellules migrant avec une forme très arrondie, soit par des cellules qui avancent grâce à des protrusions sphériques appelées blebs (**Figure 23**). Ce premier mode de déplacement est plutôt rapide et donne une vitesse de déplacement de 0,4 à 5µm/min.

Au contraire, dans le mode de migration mésenchymateux, les cellules sont de forme allongée et caractérisées par la présence de protrusions spécifiques, détaillées dans le paragraphe suivant. La vitesse de migration est plus faible, de l'ordre de 0,2 à 0,4µm/min (Clark and Vignjevic, 2015).

Les cellules cancéreuses migrent également de façon collective, c'est-à-dire que les cellules gardent des jonctions cellules-cellules et migrent ensemble (Shih and Yamada, 2012). Ce mode de migration est lent, avec des vitesses de 0,01 à 0,05µm/min. Là encore, plusieurs phénotypes migratoires ont été observés. Les cellules migrent en paquets, en chaines ou en feuillets (**Figure 23**). Quelle que soit la forme adoptée, la migration collective est également caractérisée par la présence de plusieurs phénotypes cellulaires, entre des cellules leaders et des cellules suiveuses. Les cellules leaders ont des formes proches de celle des cellules migrant individuellement mais restent attachées aux cellules suiveuses. Les cellules leader tirent l'ensemble des cellules suiveuses et jouent un rôle prédominant dans l'invasion du stroma (Khalil and Friedl, 2010).

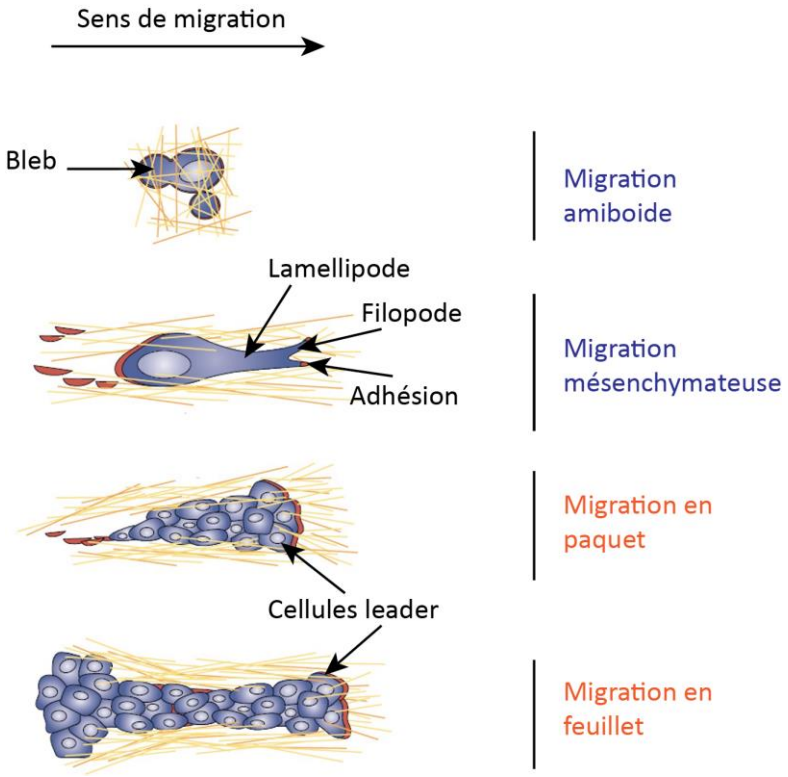


Figure 23: Modes de migration des cellules cancéreuses

Les modes de migration individuels sont légendés en bleu. Dans ces modes, les cellules individualisées ont une forme caractéristique et avancent par formation de protrusions. Les modes de migration collectifs figurent en orange. Ils se distinguent par l'existence de différents phénotypes au sein des cellules, entre les cellules leader à l'avant du groupe et les cellules suiveuses en arrière. Schéma adapté de (Friedl and Wolf, 2003).

Les modes de migration adoptés par les cellules cancéreuses diffèrent selon le type de cancer. On se focalisera ici sur le cas de notre modèle d'étude, le cancer du sein.

b) Cas des cellules cancéreuses mammaires

Afin d'observer la migration des cellules cancéreuses in vivo, des modèles de xénogreffes de cellules fluorescentes ont été générés. Ainsi, des cellules cancéreuses mammaires de rat exprimant une actine couplée à la GFP et du collagène fluorescent bleu ont été injectées dans la glande mammaire de souris. Les tumeurs résultantes sont analysées en microscopie sur animal anesthésié vivant. Dans ce modèle, 5% des cellules tumorales sont motiles, parmi lesquelles une majorité migre de façon individuelle et 20% environ adopte une migration collective (Giampieri et al., 2009).

En répétant le même type d'expériences avec cette fois des xénogreffes de cellules mammaires humaines (lignées cellulaires MDA MB 231 et TN1), on observe également deux types de migration des

cellules cancéreuses : migration individuelle et migration collective en chaine d'au moins deux cellules qui se suivent. Environ la moitié des cellules migre de manière individuelle et l'autre moitié de façon collective, quel que soit le type cellulaire injecté. De façon intéressante, le mode de migration semble lié à l'environnement tumoral, puisque la migration en chaîne est positivement corrélée à la présence de vaisseaux sanguins dans les 100µm à proximité des cellules cancéreuses (Patsialou et al., 2013).
L'impact du microenvironnement tumoral sur les propriétés migratoires des cellules cancéreuses mammaires a été examiné par Gligorijevic et collègues. Dans cette étude où des MDA MB 231 fluorescentes sont injectées dans la glande mammaire de souris, on retrouve une migration cellulaire individuelle. Deux groupes se distinguent : les cellules qui migrent rapidement et celles qui migrent lentement et forment des invadopodes. En traitant les souris avec du L-ribose, la rigidité des collagènes de la matrice extracellulaire est augmentée et avec elle la proportion de cellules migrant lentement. Les paramètres de la matrice extracellulaire influencent donc la migration des cellules cancéreuses *in vivo* (Gligorijevic et al., 2014).
Les modèles de xénogreffes murines ont permis de visualiser les cellules cancéreuses migrant *in vivo* chez l'animal et indiquent que les cellules mammaires peuvent migrer de façon individuelle ou collective. Mais qu'en est-il réellement chez l'Homme ? Cette question reste en partie ouverte à cause de limitations techniques. Néanmoins, en histologie, des groupes de cellules tumorales constituant un front invasif sont visibles, indiquant qu'une migration collective existe bel et bien. En revanche, il est plus difficile d'observer des cellules individuelles avec ce type de technique. Cependant, la capacité des cellules humaines MDA MB 231 à migrer de façon individuelle dans les souris suggère que des phénomènes similaires se produisent chez l'Homme.

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé des modèles in vitro permettant de caractériser la migration individuelle des cellules mammaires. Aussi, je me restreindrai par la suite à la description détaillée du phénotype migratoire individuel mésenchymateux, qui correspond à mes conditions expérimentales.

2. Principaux aspects de la migration cellulaire mésenchymateuse

a) Etapes de la propulsion cellulaire

Le processus de migration consiste en une répétition de cycles qui conduit au déplacement de la cellule. Chaque cycle se décompose en trois phases : (1) formation d'une protrusion propulsant la membrane plasmique vers l'avant, (2) adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire et formation de fibres de stress et (3) contraction du corps cellulaire et rétraction de l'arrière de la cellule (**Figure 24**).

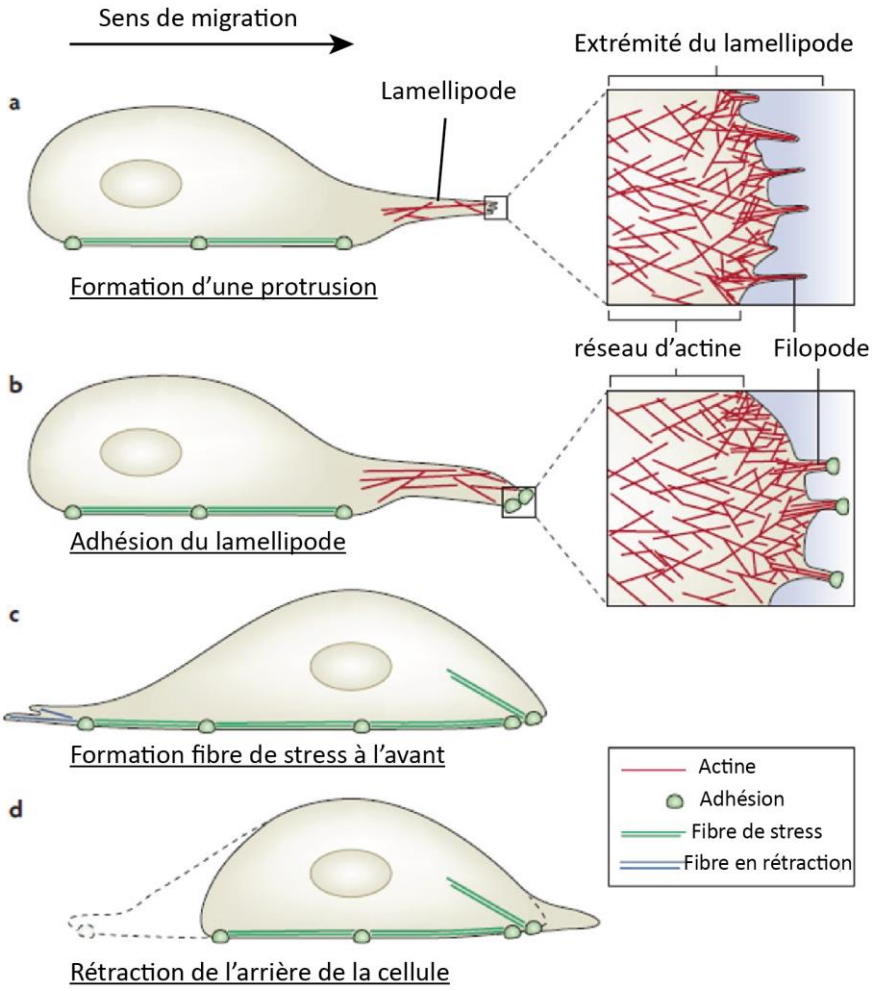


Figure 24: Etapes de la migration mésenchymateuse

***a** : A l'avant de la cellule, une protrusion principale se forme : le lamellipode. A l'extrémité du lamellipode, la membrane fait des protrusions de plus petite taille, les filopodes. **b** : Le lamellipode adhère à la matrice extracellulaire au niveau des adhésions. **c** : Les adhésions mâtures ou adhésions focales donnent naissance à des fibres de stress qui engendrent une tension à l'avant de la cellule. **d** : L'arrière de la cellule se rétracte. La cellule s'est déplacée et un nouveau cycle peut débuter. N.B : les étapes b et c correspondent à l'étape (2) définie dans le corps de texte. Adapté de (Mattila and Lappalainen, 2008)*

Formation d'une protrusion

Une protrusion se forme par polymérisation d'actine sous-membranaire, repoussant ainsi la membrane plasmique en avant. Dans le cas de la migration mésenchymateuse, deux types de protrusions sont observables. Les filopodes se forment par polymérisation de filaments d'actine parallèles entre eux, donnant une protrusion de la forme d'un doigt. Ce sont des structures très dynamiques qui s'instaurent et se rétractent en quelques minutes. Les filopodes établissent des

contacts transitoires avec la matrice extracellulaire qui sont probablement responsables de la reconnaissance des propriétés de la matrice (composition, dureté) par la cellule en migration (Jacquemet et al., 2015).

Le second type de protrusion est le lamellipode, large protrusion qui se forme à l'avant de la cellule par polymérisation d'un réseau de filaments d'actine. Les clichés de lamellipode en microscopie électronique révèlent que le réseau d'actine se construit par polymérisation de nouveaux filaments par branchement sur des filaments préexistants (Vinzenz et al., 2012). La nucléation d'un nouveau filament d'actine est initiée au niveau des complexes Arp2/3 présents sur le filament d'actine mère, selon un angle fixe de 70° (**Figure 25**). Cependant, les complexes Arp2/3 seuls sont inactifs et la nucléation ne se produit qu'en présence d'un complexe activateur appelé WAVE (Eden et al., 2002). Le réseau d'actine est également stabilisé par la présence de protéines de coiffe (CP) qui empêchent l'élongation des extrémités des filaments d'actine, favorisant ainsi la nucléation de nouveaux filaments (Akin and Mullins, 2008). Enfin, la dynamique du réseau est assurée par dégradation des filaments d'actine anciens, assurée par les protéines ADF/cofiline.

Au niveau de la base du lamellipode, le réseau d'actine s'assemble cette fois en filaments parallèles et cette région est appelée lamelle (Bisi et al., 2013).

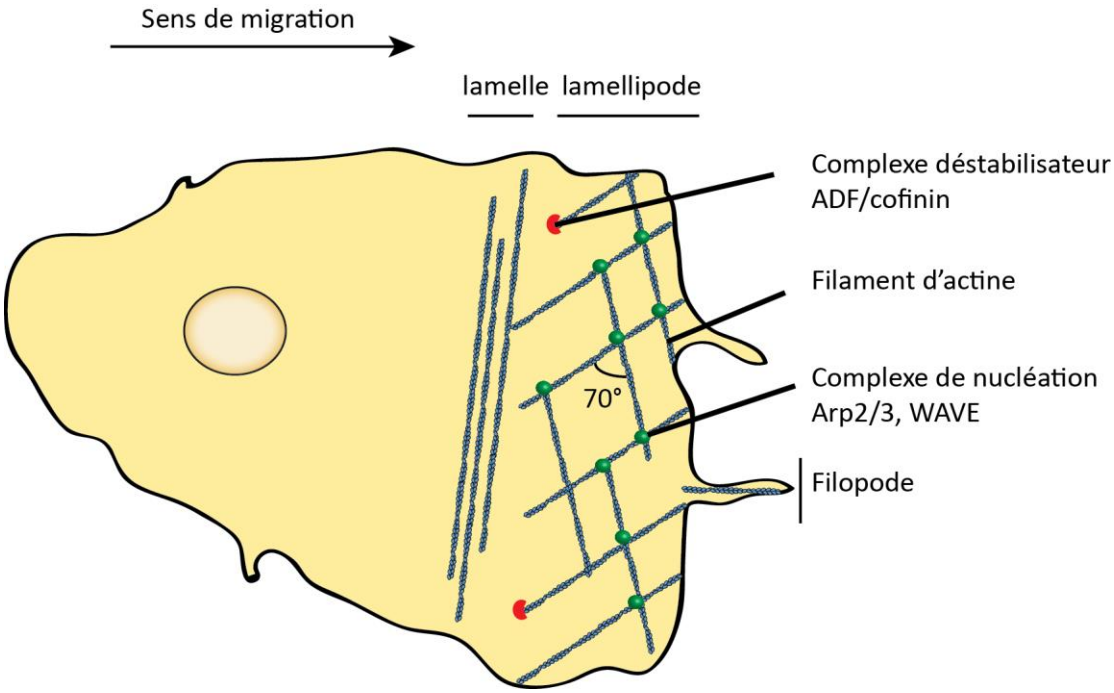


Figure 25: Assemblage du réseau d'actine dans le lamellipode

En termes d'assemblage de l'actine, trois régions sont distinguables dans le lamellipode : le filopode où les filaments sont parallèles entre eux et orthogonaux à la membrane, le lamellipode sensu stricto constitué d'un réseau et la lamelle où les filaments sont parallèles.

Adhésion à la matrice extracellulaire

L'adhésion à la matrice extracellulaire s'effectue au niveau de complexes protéiques transmembranaires qui se mettent en place dans les filopodes ou les lamellipodes. Les adhésions font intervenir plusieurs stades de maturation, depuis des adhésions immatures vers les adhésions focales qui sont les plus stables. Les adhésions immatures sont pour la plupart transitoires et se forment à l'avant du lamellipode ou des filopodes. Les adhésions focales sont plus stables et se rencontrent au niveau de la lamelle, en arrière du lamellipode. La capacité des cellules à migrer selon le mode mésenchymateux repose sur la dynamique des adhésions à la matrice extracellulaire : sans adhésion, pas de migration mais, *a contrario,* des adhésions trop stables empêchent la cellule de se déplacer.

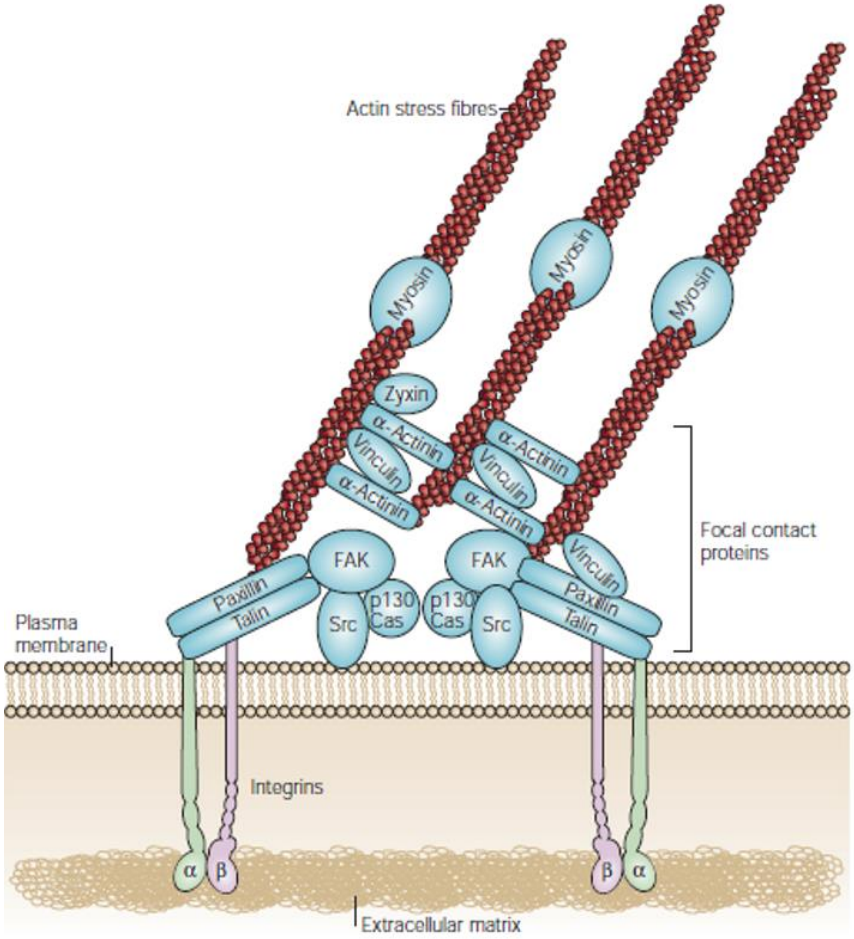


Figure 26: Organisation moléculaire des adhésions focales

Les intégrines sous forme de dimères interagissent avec les composants de la matrice extracellulaire, en particulier la fibronectine. Au niveau du cytosol, les protéines FAK et Src sont recrutées, puis la paxilline, la taline et la vinculine stabilisent le complexe multi-protéique. Ces trois dernières protéines lient les filaments d'actine. Figure extraite de (Mitra et al., 2005)

La formation d'une adhésion immature commence par la liaison entre des intégrines et la matrice extracellulaire. Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires qui s'associent sous forme de dimères (un monomère alpha et un monomère béta) et interagissent avec les protéines de la matrice extracellulaire. Une fois l'interaction établie, les intégrines recrutent des protéines au niveau de leur domaine intracellulaire. La protéine FAK (Focal Adhesion Kinase) est recrutée en premier, s'autophosphoryle sur la tyrosine 397 par liaison avec l'intégrine et permet le recrutement de Src (Lawson and Burridge, 2014). La maturation de l'adhésion se poursuit par l'interaction de FAK et Src avec d'autres protéines adaptatrices, telles que la paxilline, la taline ou la vinculine (Lawson et al., 2012). La taline et la vinculine interagissent directement avec l'actine (**Figure 26**).

Au niveau de la lamelle, à l'arrière du lamellipode, les filaments d'actine sont dépolymérisés et les adhésions transitoires désassemblées. Seules quelques adhésions poursuivent leur maturation sous le contrôle de molécules d'actine et de myosine non musculaire de type II, assemblées en paquet. De façon concomitante à la maturation de l'adhésion, le paquet d'actine et de myosine s'organise ensuite en filaments, reliés les uns aux autres par l'intermédiaire de l'alpha-actinine. L'ensemble des filaments actine/myosine II génère alors des fibres de stress. L'adhésion focale correspond au stade où le complexe d'adhésion est connecté aux fibres de stress (Case and Waterman, 2015).

Contraction du corps cellulaire et rétraction de l'arrière de la cellule

Au niveau des adhésions focales, la cellule est fortement ancrée à la matrice extracellulaire, tandis que la croissance du lamellipode continue de projeter la cellule vers l'avant. De plus, au niveau des fibres de stress, le déplacement de la myosine II le long des filaments d'actine engendre un glissement relatif des filaments d'actine au sein de la fibre, ce qui se traduit par une contraction des fibres de stress (Aguilar-Cuenca et al., 2014). La force contractile générée se transmet aux adhésions focales qui deviennent des zones de tension. La tension s'exerce plus particulièrement sur des molécules telles que la taline ou la vinculine (Grashoff et al., 2010). Par conséquent, les fibres de stress contractent le corps cellulaire, tandis que les adhésions focales tirent le corps cellulaire vers l'avant.

En ce qui concerne l'arrière de la cellule, la rétraction cellulaire dépend principalement de la force contractile générée par le glissement relatif de la myosine II (en particulier l'isoforme IIB plus abondant à l'arrière de la cellule) sur l'actine au sein des fibres de stress, force qui tire l'arrière de la cellule vers l'avant. Ce mécanisme semble particulièrement important pour l'invasion des cellules cancéreuses mammaires dans un environnement en trois dimensions (Poincloux et al., 2011). En dernier lieu, les adhésions à l'arrière de la cellule sont désassemblées par traction exercée par les fibres de stress ou par dégradation des composants des adhésions (Cramer, 2013).

La migration cellulaire est un processus finement régulé. Dans les paragraphes suivants, je détaille quelques mécanismes de contrôle de la migration, en insistant finalement sur le rôle clé exercé par le calcium.

b) Contrôle interne de la migration exercé par les Rho GTPases

Les Rho GTPases sont une famille de petites protéines qui existent sous deux formes, une liée au GDP et l'autre au GTP. Les Rho GTPases sont inactives lorsqu'elles lient le GDP, elles peuvent alors échanger le GDP contre du GTP, grâce à la coopération avec des protéines GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor). Une fois liées au GTP, les Rho GTPases sont actives et modulent l'activité de leurs cibles. Les RhoGTPases hydrolysent le GTP, sous le contrôle des GAP (GTPase Activating Protein) (Murali and Rajalingam, 2014). Parmi les vingt membres de la famille des Rho GTPases, trois protéines ont été largement décrites pour leur effet sur la migration cellulaire. Il s'agit de Rac1, RhoA et Cdc42.

La protéine Rac1 se trouve de façon prépondérante à l'avant de la cellule où elle contrôle la dynamique du lamellipode, en activant la nucléation des filaments d'actine. En effet, Rac1 dissocie le complexe dans lequel WAVE est emprisonné, WAVE est alors activé et peut à son tour promouvoir la nucléation des filaments d'actine au niveau de complexes Arp2/3 (Eden et al., 2002).

En ce qui concerne Cdc42, la surexpression de mutants inactifs de cette protéine conduit à des défauts de polarité dans les astrocytes en migration. En revanche, des mutants de Rac1 ou de RhoA ont peu d'effet sur la polarité des cellules, indiquant un rôle prépondérant de Cdc42 dans la mise en place de la polarité cellulaire de la cellule en migration (Etienne-Manneville and Hall, 2001). Cdc42, tout comme Rac1, active la polymérisation de l'actine au niveau de l'avant de la cellule mais contrôle plus particulièrement la formation des filopodes.

RhoA est activée à la fois à l'avant et à l'arrière de la cellule en migration où elle contrôle la mise en place des fibres de stress mais également les ondulations de la membrane plasmique (Kurokawa and Matsuda, 2005).

c) Contrôles extracellulaires de la migration

Dans un contexte *in vivo*, les cellules cancéreuses peuvent migrer de façon aléatoire ou bien de manière dirigée par des signaux extracellulaires. Les cellules sont ainsi attirées par des gradients de facteurs de croissance ou autres signaux chimiques. D'autres types de gradients peuvent influencer la migration, tels que des gradients mécaniques liés à la dureté de la matrice extracellulaire (Bear and Haugh, 2014). Dans notre équipe, nous montrons également que les cellules migrent vers les zones bien oxygénées, s'échappant ainsi des zones en hypoxie (Deygas et al, en préparation).

3. Contrôle de la migration cellulaire par le calcium

a) Répartition du calcium cytosolique dans les cellules en migration

La première mesure de calcium sur cellules en migration a été réalisée sur des éosinophiles micro-injectés avec la sonde cytoplasmique Fura-2. Lorsque les cellules migrent, la concentration basale en calcium intracellulaire est plus élevée (120nM) que pour des cellules immobiles (80nM). De plus, lorsque les cellules sont placées dans un gradient de sérum, un gradient de concentration calcique s'établit entre l'avant de la cellule (faible concentration) et l'arrière (fortes concentrations) (Brundage et al., 1991). Les mesures précises de calcium intracellulaire ont cependant été limitées dans les années suivantes par les techniques d'imagerie ainsi que par la qualité des sondes utilisées. Les progrès effectués sur ces deux fronts ont permis de mieux caractériser les propriétés calciques des cellules en migration dès les années 2000. Plusieurs études indiquent qu'en plus du gradient basal décrit par Brundage et collègues, le cytoplasme des cellules en migration est régulièrement sujet à des pics ou des vagues calciques. Par exemple, les cellules de fibrosarcome HT1080 en migration présentent des pics calciques cytoplasmiques de moins d'une seconde et qui engendrent un signal périodique de pics calciques toutes les 30 secondes environ. Ces pics sont observés dans toutes les zones du cytoplasme (Huang et al., 2004).

En 2009, des pics de calcium locaux (5µm) et transitoires (quelques secondes) ont été visualisés dans des cellules en migration. Contrairement au signal enregistré par Huang et al, ces pics de calcium sont préférentiellement observés dans le lamellipode. De façon remarquable, le gradient basal en calcium décrit par Brundage est également visible dans les fibroblastes utilisés par Wei et collègues (**Figure 27**). En dernier lieu, les pics calciques sont corrélés à la direction de migration des cellules. Par exemple, si une cellule tourne vers la gauche, les pics de calcium se retrouvent majoritairement au niveau de la partie gauche du lamellipode (Wei et al., 2009). Les pics calciques locaux ont également été étudiés dans un modèle de migration collective où les cellules leader présentent des pics calciques transitoires au niveau du lamellipode. Les pics induisent la contraction de la myosine II, ce qui a un double effet : rétraction locale du lamellipode et augmentation de la force de tension au niveau des adhésions (Tsai and Meyer, 2012).

L'ensemble de ces données indique que le calcium est réparti de façon polarisée dans les cellules en migration. Quels sont alors les mécanismes moléculaires à l'origine de cette répartition ?

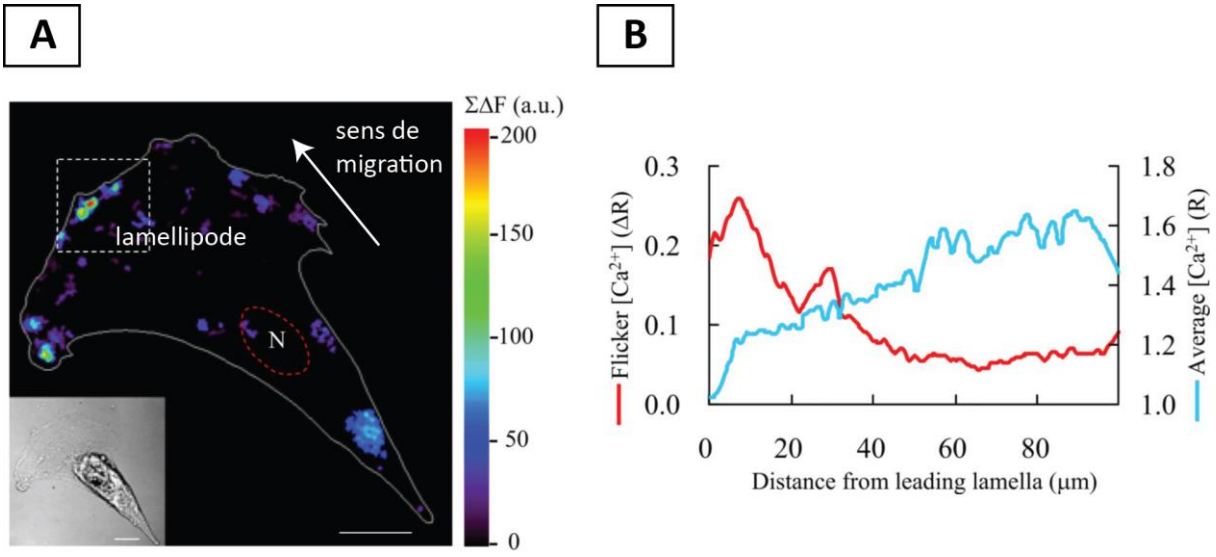


Figure 27: Mesure du calcium dans un fibroblaste en migration

***A** : Pics de calcium dans une cellule en migration. La cellule a été chargée avec la sonde fluorescente Fluo-4 et la fluorescence émise a été mesurée à raison de 30 images toutes les 6s. Le gradient de couleur correspond à la somme des intensités de fluorescence enregistrées pendant ce laps de temps. On visualise ainsi des pics de calcium locaux. Les pics sont les plus abondants et de plus forte amplitude dans le lamellipode et en particulier en arrière de la membrane plasmique. **B** : Comparaison du gradient de pics calciques (en rouge) et du gradient de concentration moyenne en calcium cytosolique (en bleu). Les pics transitoires se forment surtout à l'avant de la cellule tandis la concentration basale en calcium est plus importante à l'arrière de la cellule. D'après (Wei et al., 2009)*

b) Canaux calciques et migration des cellules

Canaux responsables du taux basal de calcium des cellules en migration

L'utilisation de caloxine et de La^{3+} (inhibiteurs de la pompe PMCA) abolit le gradient calcique avant/arrière des cellules en migration, suggérant que la pompe PMCA est responsable du maintien de ce gradient. De plus, la localisation de PMCA dans les cellules est polarisée : on trouve davantage de PMCA à l'avant des cellules qu'à l'arrière (Tsai et al., 2014). La pompe PMCA est donc un acteur important de l'homéostasie calcique des cellules en migration.

Les principaux composants du SOCE, Orai1 et Stim1 régulent migration et invasion des cellules cancéreuses mammaires. En effet, les cellules mammaires MDAMB231 transfectées avec une combinaison d'ARNsi dirigés contre STIM1 et Orai1 diminue drastiquement la capacité des cellules à migrer dans des dispositifs *in vitro* tels que la chambre de Boyden ou le tracking de cellules

individuelles. Les cellules KD pour le SOCE peinent également à former des métastases en xénogreffe. D'un point de vue mécanistique, STIM1 et Orai1 contrôlent la migration en régulant le turnover des adhésions focales (Yang et al., 2009).

Les canaux calciques intracellulaires mitochondriaux ont eux aussi été décrits pour leur rôle dans la migration cellulaire. Notre équipe a montré dans le modèle du poisson zèbre que la modulation du canal VDAC par Bcl-wav contrôlait la migration des cellules embryonnaires au cours de la gastrulation (Prudent et al., 2013). De la même manière dans des cellules humaines, Mcl-1 via VDAC augmente l'entrée de calcium mitochondrial et ainsi la migration de cellules cancéreuses pulmonaires (Huang et al., 2014). Si le canal VDAC permet au calcium de franchir la membrane mitochondriale externe, c'est le canal MCU qui régit l'entrée de calcium depuis l'espace intermembranaire vers la matrice. De façon intéressante, le knockdown du canal intra-mitochondrial MCU engendre lui aussi des défauts de migration des cellules embryonnaires du poisson zèbre (Prudent et al., 2013). Plus récemment, notre équipe a établi le rôle de MCU dans la migration des cellules humaines. Le KD de MCU par ARNsi provoque une phosphorylation accrue des chaines légères de la myosine II et des défauts de renouvellement des adhésions focales, ce qui contribue à ancrer la cellule à son substrat et donc à inhiber la migration (Prudent et al., 2016).

Canaux à l'origine des pics transitoires de calcium

Dans l'étude de Wei et collègues, les pics calciques sont engendrés par l'ouverture des canaux membranaires TRPM7, provoquant l'entrée de calcium extracellulaire dans le cytosol. Les canaux TRPM7 sont des mécano-senseurs, ils s'ouvrent lorsque la membrane est en tension. Par conséquent, lorsqu'un peptide RGD (motif de la fibronectine reconnu par les intégrines) est ajouté au milieu extracellulaire, il se produit davantage d'adhésions cellules/matrice ; ce qui augmente la probabilité d'ouverture de TRPM7. En plus des flux calciques médiés par TRPM7, l'amplitude des pics calciques est contrôlée par ouverture du récepteur IP3R via un mécanisme de CICR (Wei et al., 2009).

Au-delà du mécanisme de CICR, le récepteur à l'IP3 s'ouvre en présence de fortes concentrations en IP3. Il semble que ce mécanisme soit impliqué dans la génération des pics calciques transitoires localisés (Tsai et al., 2015).

L'ensemble des canaux transmembranaire décrits ci-dessus assure le maintien de l'homéostasie calcique lors de la migration (**Figure 28**). Ce calcium va ensuite moduler des cibles protéiques calcium-dépendantes.

c) *Principaux effecteurs calciques impliqués dans la migration cellulaire*

Effecteurs liés au cytosquelette et aux adhésions

La MLCK (Myosin Light Chain Kinase) est sans doute un des effecteurs calciques les mieux décrits. Cette protéine est activée en présence de calcium via un mécanisme impliquant la calmoduline. La MLCK activée phosphoryle la sérine 19 des chaines légères de la myosine, ce qui active l'activité ATPasique des têtes de myosine et *in fine* la contraction des fibres de stress (Somlyo and Somlyo, 2003). Ainsi, les pics calciques se produisant au niveau de la lamelle activent localement la MLCK ce qui forme des zones de rétraction locales dans le lamellipode (Tsai and Meyer, 2012). D'autres régulateurs du cytosquelette sont également sous contrôle calcique, telle que la protéine S100A4 majoritairement présente au niveau du lamellipode et partenaire de la myosine II (Kim and Helfman, 2003). S100A4 contrôle également les propriétés invasives des cellules en induisant l'expression de MMP9 (Matrix MetalloProteinase), facteur de dégradation de la matrice extracellulaire (Prevarskaya et al., 2011).

Les adhésions focales sont dépendantes du calcium à la fois pour leur assemblage et pour leur désassemblage. La protéine FAK est recrutée au niveau des adhésions sous l'action de la CAMKII (Calmodulin-dependent protein kinase II) et donc du calcium. De plus, l'autophosphorylation de FAK au niveau des adhésions corrèle avec des pics calciques locaux et transitoires, suggérant un rôle direct du calcium sur la modulation de l'activité de FAK (Prevarskaya et al., 2011).
La destruction des adhésions focales à l'arrière de la cellule est en partie régulée par le calcium, selon deux mécanismes. Le calcium via la phosphatase calcineurine est responsable du turnover des intégrines au niveau de l'arrière de la cellule (Lawson and Maxfield, 1995). Le calcium est encore impliqué dans la dégradation des composants des adhésions focales. En effet, en traitant les cellules avec des inhibiteurs de la calpaine, protéase calcium-dépendante, les intégrines des adhésions focales sont plus stables et la destruction des adhésions à l'arrière de la cellule est inhibée (Huttenlocher et al., 1997).

Effecteur impliqué dans des voies de signalisation

La protéine kinase C (PKC) est activée par fixation de diacylglycérol et de calcium, faisant de PKC un effecteur calcique lié à des voies de signalisation extracellulaire. PKC est un important régulateur des adhésions focales, à la fois en ce qui concerne l'assemblage et le désassemblage de ces structures. Parmi les partenaires de PKC, on retrouve la taline et la vinculine. Cependant, l'effet exact de PKC sur ces deux composants des adhésions n'est pas encore élucidé (Fogh et al., 2014). PKC phosphoryle également la myosine II au niveau des chaines lourdes de myosine.

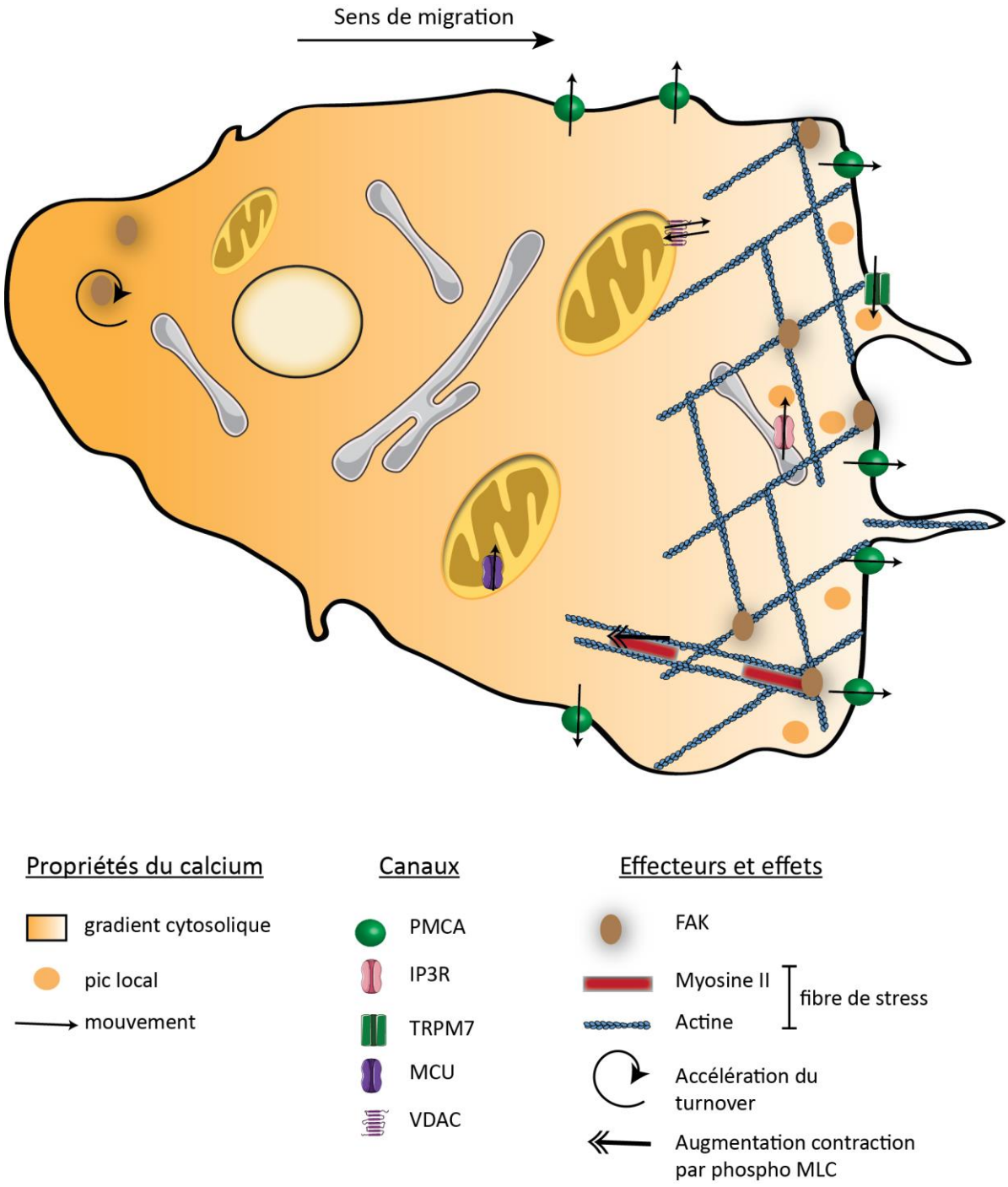


Figure 28: Bilan du rôle du calcium sur une cellule en migration

Introduction au sujet de thèse

Ainsi que je l'ai discuté lors de l'introduction bibliographique, de nombreuses fonctions non canoniques sont décrites pour les protéines Bcl-2. En particulier, les études de notre équipe dans le modèle du poisson zèbre ont contribué à enrichir les connaissances dans ce domaine. En effet, l'invalidation des orthologues Nrz et Bcl-wav dans les embryons de poisson zèbre provoquent des défauts de développement de l'embryon, tels que l'arrêt de la gastrulation et la malformation des somites respectivement (Popgeorgiev et al., 2011; Prudent et al., 2013). De façon intéressante, les phénotypes Nrz et Bcl-wav KD sont maintenus même en présence d'inhibiteurs de caspases. De ce fait, le rôle de ces gènes dans le développement est indépendant du contrôle de l'activité des caspases. En ce qui concerne Bcl-wav, la malformation des somites résulte d'un défaut de migration cellulaire au moment de la gastrulation : les cellules mésodermiques des embryons Bcl-wav KD migrent de façon aléatoire par formation de protrusions d'actine non-orientées, contrairement aux cellules des embryons contrôle qui elles migrent dans la même direction (Prudent et al., 2013). Ces résultats soulignent l'importance des orthologues de la famille Bcl-2 dans le développement précoce, et en particulier leur rôle dans la migration cellulaire lors de la gastrulation.

Chez l'Homme, la migration cellulaire est également un phénomène clé lors du développement embryonnaire mais aussi au cours de la vie adulte (cicatrisation, système immunitaire…). Dans le contexte pathologique du cancer, l'acquisition d'un phénotype migratoire par les cellules cancéreuses est l'un des pré-requis à la formation des métastases, ces tumeurs secondaires souvent à l'origine de la létalité de la maladie (Mehlen and Puisieux, 2006). Les gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont surexprimés dans les cancers. Dans le cas du cancer du sein, ce sont les gènes *Bcl-x* et *Mcl-1* qui sont les plus fréquemment altérés. Bcl-xL a été très tôt identifié comme un marqueur de progression tumorale (Olopade et al., 1997). De plus, de précédentes études sur les effets de Bcl-xL sur les cellules mammaires conduisent à des observations intéressantes. Par exemple, les xénogreffes de lignées mammaires MDA MB 435 ou MDA MB 231 surexprimant Bcl-xL donnent des tumeurs primaires de taille identique aux cellules contrôle. En revanche, le nombre et la taille des métastases pulmonaires est drastiquement augmenté (Fernández et al., 2000; Martin et al., 2004). Dans les cellules HMLE (Human Mammary Large T-antigen immmortalized Epithelial cells), Bcl-xL est surexprimé dans la sous-population mésenchymateuse par rapport aux cellules épithéliales de la même lignée. Parallèlement, le marquage de Bcl-xL en immunohistochimie sur des échantillons de tumeurs mammaires humaines révèle que Bcl-xL est préférentiellement surexprimé au niveau des fronts invasifs des tumeurs ainsi qu'au niveau des ilots de cellules invasives isolées dans le stroma (Keitel et al., 2014). L'ensemble de

ces données souligne l'importance de Bcl-xL dans la formation de métastases. De plus, ces constatations se confirment dans d'autres types de cancers : cancers pulmonaires, gliomes, cancers pancréatiques (Du et al., 2007a; Karczmarek-Borowska et al., 2006; Weiler et al., 2006).

En compilant les données obtenues par notre équipe aux données de la littérature, nous avons émis l'hypothèse que Bcl-xL pouvait contrôler la migration et l'invasion cellulaire. Pour tester cette hypothèse, nous avons sélectionné le modèle des cellules cancéreuses mammaires dans lesquelles Bcl-xL est fortement exprimé et confère un mauvais pronostic aux patientes, contrairement à Bcl-2. A la fois le knockdown et le knockout de Bcl-xL ralentit la migration des cellules mammaires, et ce dans plusieurs modèles *in vitro* ainsi que dans un modèle d'invasion *in vivo*.
Nous avons ensuite cherché si ce rôle sur la migration pouvait être découplé de la fonction anti-apoptotique de Bcl-xL. Les données obtenues avec traitement par des inhibiteurs de caspases ou des BH3 mimétiques indiquent que les deux fonctions sont indépendantes, et dès lors s'est posée la question du mécanisme par lequel Bcl-xL contrôle la migration. Comme plusieurs études sur les protéines Bcl2 stipulent que leur fonction dépend de leur localisation subcellulaire, nous avons déterminé la contribution des pools mitochondriaux et réticulaires de Bcl-xL dans le contrôle de la migration. Il s'avère que c'est la protéine mitochondriale qui joue un rôle prédominant. En dernier lieu, nous avons montré qu'un peptide dérivé du domaine BH4 de Bcl-xL suffit à inhiber la migration cellulaire, soulignant l'importance de ce domaine dans la régulation du processus de migration. Les données de la littérature concernant ce domaine suggèrent que Bcl-xL contrôle la migration en modulant le canal mitochondrial VDAC, par l'intermédiaire du domaine BH4.

Résultats

Article n°1

The mitochondrial pool of the anti-apoptotic protein Bcl-xL controls cell migration of mammary cancer cells

Margaux Bessou, Jonathan Lopez, Rudy Gadet, Delphine Poncet, Adrien Nougarède, Nikolay Popgeorgiev, Ruth Rimokh* and Germain Gillet*.

In preparation for submission

Abstract

The Bcl-xL apoptosis inhibitor plays a major role in vertebrate development. There is evidence that, in addition to its effect on apoptosis, Bcl-xL, plays other roles, including in cell migration and mitochondrial metabolism. These effects may contribute to favor the onset and the dissemination of metastasis. However the underlying molecular mechanisms remain to be fully understood. Here we focused on the control of cell migration by Bcl-xL in the context on breast cancer cells. We show that Bcl-xL silencing leads to migration defects in HS578T cells. These defects we found to be rescued by re-expression of mitochondria- adressed, but not endoplasmic reticulum-adressed, Bcl-xl. The use of BH3 mimetics, such as ABT-737 and WEHI-539 confirmed that the effect of Bcl-xL on migration is independent of the inhibition of death accelerators such as Bax or BH3 only proteins. In contrast, the use of a BH4 peptide that disrupts the Bcl-xL-VDAC complex supports the idea that Bcl-xL may contribute to cell migration by controlling mitochondrial Ca2+ uptake via VDAC Ca2+ permeability.

Introduction

Bcl-xL belongs to the Bcl-2 family of proteins and is encoded by the gene *BCL2L1*. The Bcl-2 family has been extensively described for its role in controlling cell death[1]. According to their structure and functions, members of the family can be classified into three subgroups. The anti-apoptotic members, such as Bcl-xL or Bcl-2, share a common structure of four Bcl-2 homology (BH) domains and are pro-survival. Pro-apoptotic effector proteins such as Bax and Bak also contain four BH domains and promote the mitochondrial outer membrane permeabilization, which is considered as a point of no return in apoptotic cell death induction. The last subgroup, the so-called BH3-only proteins, only comprises the BH3 domain and exerts pro-apoptotic functions by neutralising anti-apoptotic members and activating BAX/BAK. By those means, members of the family maintain a balance between cell survival and cell death [2].

Besides the control of apoptosis, emerging functions of Bcl-2 proteins have been recently described[3]. We have previously shown that knocking down the Bak ortholog Bcl-wav leads to severe developmental defects in the zebrafish model[4]. These defects were due to a diminished cell migration capability, thus supporting a new function for Bcl-2 proteins. Furthermore, we reported that Bcl-wav controlled cell migration through modulation of intracellular calcium fluxes. Interestingly, the human Bcl-2 proteins also modulate intracellular calcium channels activity. For instance, Bcl-xL interacts with the Inositol-3-phosphate receptor (IP3R), sensitising the receptor to low IP3 concentrations[5,6]. Bcl-xL also binds to the outer mitochondrial membrane channel VDAC[7]. These additional properties promote the anti-apoptotic activity of Bcl-xL but also contribute to other cellular functions, such as regulation of metabolism[8].

Bcl-xL overexpression is frequently observed in cancer. For example, its expression has been reported in lung cancer[9], hepatocellular carcinoma[10] or breast cancer[11]. Surprisingly, Bcl-xL expression in breast cancer has been correlated with enhanced metastatic potential rather than increased primary tumour growth[12,13]. Similarly, Keitel et al recently described that Bcl-xL was overexpressed specifically in the invasive front of human breast tumors[14]. Furthermore, Bcl-xL involvement in the metastatic phase of the disease has also been observed in other models, such as human glioma[15] or a mouse model of pancreactic cancer[16]. Taken together, these data suggest role of Bcl-xL in controlling tumour progression and metastasis.

Here, we compared *BCL2L1* and *BCL2* expression in breast tumors using cohorts from the TCGA. Whereas *BCL2* displayed the same expression levels in both normal and tumoral samples, *BCL2L1* expression was increased in breast tumors and this correlated with higher lymph nodes invasion. Since cell migration and invasion properties are often considered as a prerequisite for the tumoral dissemination, we hypothesized that Bcl-xL could control cell migration. In invasive mammary cell lines in which we reduced Bcl-xL expression by RNA interference and CRISPR/Cas9-mediated knockout, we observed reduced migration, suggesting that Bcl-xL controls cell migration of mammary cancer cells. Interestingly, this function was independent of its anti-apoptotic activity. To decipher contribution of mitochondrial and reticular pools of Bcl-xL, we engineered specific organelle-targeted constructs and demonstrated that only the mitochondrial Bcl-xL was able to rescue cell migration, through its binding to the VDAC channel. Importantly, our work highlights the importance of the BH4 domain of Bcl-xL in this process.

Results

Comparison of BCL2 and BCL2L1 gene expression in breast samples reveals specific features associated with BCL2L1

To better define *BCL2L1* gene involvement in breast cancer, we analysed *BCL2L1* expression in breast tumors compared to normal samples using data from the TCGA databank. As previously reported[11], we found that *BCL2L1* was overexpressed in tumors, which wasn't the case for *BCL2* (Figure 1A). Furthermore, tumors that had invaded lymph nodes showed increase *BCL2L1* expression levels compared to non-invading samples (Figure 1B). Contrarily to *BCL2L1*, there was no difference in *BCL2* expression between invading and non-invading tumors.

Next we assessed both genes expression within the breast tumor subtypes and found that *BCL2L1* and *BCL2* were overexpressed in ER-alpha positive breast tumors (Figure 1C). However, the clinical outcome associated with this overexpression was different between the genes. Indeed, *BCL2*

high expression correlated with better overall survival in TCGA and KM plotter cohorts, whereas *BCL2L1* high expression tended to reduce survival in both cohorts (Figure 1D). The results for *BCL2* are consistent with previous findings associating *BCL2* expression with good prognosis in breast cancer[17], thus validating the results obtained with the two cohorts.

Altogether, these data highlight that *BCL2L1* high expression in breast cancer is associated with increased lymph nodes invasion and poor overall survival. Furthermore, it is a specific effect of *BCL2L1*, since *BCL2* high expression instead correlates with good progonosis. Therefore, we decided to investigate the role of *BCL2L1* gene product Bcl-xL in tumor progression, by assessing Bcl-xL role on cell migration and invasion.

Impaired Bcl-xL expression leads to migration defects

To investigate Bcl-xL function on cell migration, we used the highly invasive basal mammary cancer cell line Hs578T[18] as a model and performed siRNA-mediated knockdown (KD) of Bcl-xL. siRNA 1 and 2 targeting the 3' UTR region of Bcl-xL mRNA efficiently reduced Bcl-xL expression (Figure 2A). To limit interference with Bcl-xL functions on apoptosis or proliferation[19], we measured individual migration of Bcl-xL KD cells by single cell tracking experiments. Compared to the cells transfected with a scrambled siRNA, cells knocked-down for Bcl-xL showed reduced trajectories (Figure 2B) and reduced cell speed (Figure 2C), suggesting that Bcl-xL knockdown may impair cell migration. To confirm this result, we performed a Boyden chamber assay. In this directed migration assay, cells migrate towards high concentration of serum. In agreement with previous results, Bcl-xL KD cells showed a reduced capacity to cross the membrane (Figure 2D).

To rule out off-target effects of the siRNA approach, we knocked-out (KO) Bcl-xL using the CRISPR/Cas 9 system[20] (Figure 2E). Hs578T KO cells also showed a slower migration compared to control stable cell line containing CRISPR/Cas9 empty vector (Figure 2F). To test whether this effect was cell type dependent, we knocked-out Bcl-xL in another mammary cancer cell line (BT20) which also displays high migrating properties (Figure 2E). BT20 Bcl-xL KO cells also failed to migrate as efficiently as the control cells, confirming that Bcl-xL control of cell migration is cell type independent (Figure 2F).

Finally we evaluated the impact of Bcl-xL KO on Hs578T invasion properties using a zebrafish xenograft model[21]. Equal amount of fluorescently-labelled Hs578T control and KO cells were co-injected into the yolk of 24h-old zebrafish embryos. Successfully injected embryos were subsequently incubated at 30°C for two days. At the end of the incubation time, the number of cell foci having escaped the injection site and invaded the tail were counted (Figure 2G). Remarkably, more Hs578T control cells were present in the tail, compared to Bcl-xL KO cells (Figure 2H). These results thus confirmed in an *in vivo*-related context that Bcl-xL KO cells display impaired cell motility.

Altogether, our data point out the involvement of Bcl-xL in promoting cell migration of mammary cancer cell lines.

Bcl-xL control of cell migration is independent of its anti-apoptotic activity

Next, we decided to investigate whether Bcl-xL effect on cell migration was related to its effect on apoptosis. First, we noticed that knocking-down Bcl-xL induced an only limited caspase activation (Figure 3A). However as expected, Bcl-xL KD strongly sensitized cells to staurosporine-induced cell death (Figure S1A). To definitely rule out that reduction of cell migration may be due to induction of cell death we repeated the initial experiments in presence of zVAD-fmk, a pan-caspase inhibitor. Importantly Bcl-xL KD cells displayed reduced cell speed compared to control even when caspase-dependent cell death was inhibited (Figure 3B). As a control, we showed that zVAD-fmk treatment consistently reduced staurosporine-induced cell death in Hs578T cells (Figure S1A). This result suggests that Bcl-xL function on cell migration is independent from its anti-apoptotic activity.

Then we reasoned that if this observation was true, the sole inhibition of the anti-apoptotic function of Bcl-xL shouldn't impact on cell migration. The anti-apoptotic function of Bcl-xL mainly relies on binding to the BH3 domain of the pro-apoptotic members, that can interact with its hydrophobic pocket[1]. This interaction can be efficiently targeted by BH3-mimetics[2]. We treated Hs578T cells either with ABT737 or ABT263 (targeting both Bcl-xL and Bcl-2)[22] or with Bcl-xL specific inhibitor WEHI539[23] and followed single cell migration as previously described. Interestingly, no change in migration behaviour was observed with any of these inhibitors compared to control cells treated with the vehicle (Figures 3C and 3D). Importantly, we confirmed that these three inhibitors strongly sensitised Hs578T cells to cell death (Fig. S1B). Therefore, Bcl-xL control of migration didn't seem to rely on its hydrophobic pocket and its interaction with pro-apoptotic members of the Bcl-2 family.

Mitochondria-targeted but not ER-targeted Bcl-xL rescues cell migration

Bcl-xL has been reported to exert different functions depending on its subcellular localization[24]. Therefore, we explored whether its subcellular localization could play a role in regulating cell migration. Performing subcellular fractionation in our model line, we found that Bcl-xL was mainly present in the mitochondrial compartment. However, a consequent fraction of the protein was also localised at the endoplasmic reticulum (ER) (Figure 4A).

To investigate the relative contribution of Bcl-xL mitochondrial and ER pool in the control of cell migration, we designed genetic constructs fully targeting Bcl-xL to each compartment. We swapped Bcl-xL transmembrane membrane domain by the one of the ActA (mitochondria) or the cytochrome b5 (ER) proteins, as previously published[25]. Those chimeric proteins showed proper subcellular localization in immunofluorescence staining (Figures 4B and 4C). To perform rescue experiments in

Hs578T KO cell line, we took advantage of the ProteoTuner inducible system (ClonTech). In this system, the protein of interest is fused to a destabilization domain that targets the protein for proteasomal degradation in the absence of its ligand[26]. When the shield1 ligand is added to the cells, the protein of interest is fully expressed (Figure S2A). We successfully re-expressed Bcl-xL WT, mitochondria-targeted or ER-targeted Bcl-xL in Hs578T KO cells, as assessed by Western blot (Figure 4D). We then performed single cell tracking experiments. Wild type Bcl-xL was able to partially rescue cell migration. Moreover, mitochondrial Bcl-xL could also rescue cell migration, whereas ER-targeted Bcl-xL couldn't (Figure 4E). This result highlights that localization of Bcl-xL at the mitochondria is required to control cell migration.

Besides interacting with other Bcl-2 family members at the mitochondria, Bcl-xL also binds to the VDAC1 channel[7,8], and by doing so regulates mitochondrial calcium uptake. In our mammary cells, knock-out of Bcl-xL increased calcium uptake of isolated mitochondria (Figures 4F and 4G). Cytosolic and ER calcium fluxes were also modified (Figures S2B, S2C, S2D, S2E). Altogether these data strongly suggest that, in our model system, Bcl-xL KO impairs calcium homeostasis. In addition, calcium is well characterised as a key regulator of cell migration properties[27]. Therefore we hypothesized that Bcl-xL control of cell migration could be mediated by the modulation of intracellular calcium fluxes at the mitochondria.

Control of cell migration by Bcl-xL involves its BH4 domain

To test this hypothesis, we investigated previous findings regarding Bcl-xL/VDAC1 interaction. Indeed, it has been described by several teams that the BH4 domain of Bcl-xL mediates its interaction with the VDAC channel[28,29]. Interestingly, our experiments showed that cell migration is not controlled by Bcl-xL hydrophobic pocket (Figure 3D) and the BH4 domain is located outside of the hydrophobic pocket. Therefore, we envisaged that this domain could be involved in Bcl-xL control of cell migration. Thus we designed peptides based on formerly described sequence of the BH4 domain of Bcl-xL[28] and used a scrambled peptide as a control. Both peptides were fused to an HIV-derived TAT sequence, to enable peptides entering the cells. The peptides were also coupled to a TAMRA fluorophore that allowed us to visualize full peptide penetrance (Figure 5A).

We loaded Hs578T cells with either TAT scr BH4 or TAT BH4 peptide and performed single cell tracking experiments. Remarkably, cells loaded with the TAT BH4 peptide showed reduced migration compared to those loaded with the TAT scr BH4 peptide (Figure 5B), thus mimicking results obtained when Bcl-xL expression was impaired. We subsequently measured mitochondrial calcium uptake of cells loaded with the peptides. TAT BH4 peptide significantly increased calcium uptake compared to TAT scr BH4 peptide (Figure 5C), again resembling results of the KO cell line. Taken together, these data suggest that the TAT BH4 peptide competes with endogenous Bcl-xL for VDAC binding. By doing

so, it inhibits cell migration and increases mitochondrial calcium uptake. Eventually, we propose that Bcl-xL regulates cell migration through its BH4 domain, likely by modulating VDAC1 channel activity.

Discussion

In vertebrates, the apoptosis inhibitor Bcl-xL is ubiquitously expressed in embryos and adults. Its role during development is illustrated by the embryonic lethal phenotype in the mouse[30]. Embryonic lethality was correlated to massive apoptosis in the nervous system and neural tube closure defect. At the molecular level, Bcl-xL is known to counteract Bax death-inducing effect at the level of the mitochondria and maintain cytochrome c in check[31].

However, in addition to the mitochondria, Bcl-xL is found in other compartments including the ER and the nucleus. There is convincing evidence that Bcl-xL interacts with the ER-resident IP3R Ca2+ channels. It was suggested that Bcl-xL may sustain mitochondrial metabolism by enhancing mitochondrial Ca2+ uptake in an IP3R-dependent manner[6]. On the other hand, the fact that Bcl-xL is able to lower ER Ca2+ levels may contribute to lower the toxicity of agents that trigger ER Ca2+ release, by limiting the subsequent increase of cytosolic Ca2+ levels and cell death due to Ca2+ overload (reviewed in [3]).

However, the Bcl-xL ER pool seems to have a minor contribution to apoptosis inhibition since, contrary to Mito-adressed Bcl-xL, ER-adressed Bcl-xL is unable to prevent cell death induced by cytotoxic agents, such as doxorubicin or staurosporine[24].

Interstingly, in the context of cancer, Bcl-xL was reported to favor metastases independently of its anti-apoptotic effect[32]. In addition, we showed that, during development, certain Bcl-2 homologs are able to control cytoskeletal dynamics and cell migration (reviewed in [33]). Here we intent to evaluate, in the context of breast cancer, the extent to which Bcl-xL could contribute to cell migration and metastatic dissemination.

We show that, in steady state conditions, Bcl-xL silencing compromises cell migration. Importantly, our complementation experiments show that mitochondria-adressed Bcl-xL, but not ER-adressed Bcl-xL, was able to fully restore the migration defects. These results are in sharp contrast to our previous data obtained in zebrafish, showing that the Bcl-2 homolog Nrz controlled cytoskeletal dynamics and blastomere migration by acting at the level of the ER but not the mitochondria [34]. Together these data indicate that Bcl-2 proteins can control cell migration via different complementary mechanisms.

In order to shed light on the molecular mechanisms underlying Bcl-xL effect on cell migration, we first checked the involvement of the apoptosis. Actually, Bcl-xL silencing does not affect caspase activity. Morever, BH3 mimetics, including wehi539, which selectively inhibits Bcl-xL, had no effect on cell migration. Thus the effect of Bcl-xL on cell migration does not depend on its ability to bind and inhibit

death accelerators with BH3 domains such as Bax or BH3 only proteins. In this respect it should be noted that although in a different context, BH3 mimetics were reported to suppress the stimulating effect of CD95 on cell migration[35], suggesting that, in these latter conditions, Bcl-xL indirectly allowed cell migration by silencing apoptosis.

We previoulsy showed that challenging the mitochondrial uptake by silencing *mcu* or *bcl-wav*, a *bak* homolog, had an impact on cell migration similar to the herein observed effect of *bcl-x* silencing[4]. However we could not observe, in steady state conditions, any significant decrease of mitochondrial Ca2+ levels in *bcl-x*-silenced cells as observed following *mcu* or *bcl-wav* knock down. In contrast, our results support that *bcl-x* silencing enhances mitochondrial Ca2+ uptake and ER Ca2+ release, suggesting that, in stress conditions, Bcl-xL lowers ER Ca2+ release and mitochondrial Ca2+ overload. It remains to be established the extent to which these latter effects of Bcl-xL on Ca2+ fluxes contribute to the control of cell migration by Bcl-xL. Nevertheless, the fact that the BH4 peptide derived from the BH4 domain of Bcl-xL recapitulates the effects of *bcl-x* silencing strongly suggests that the observed migratory defect is VDAC-dependent.

Together our results indicate that Bcl-xL contributes to cell migration via its interaction with VDAC in a BH4-dependent manner, independently of apoptosis. Whether this effect is related to the control of mitochondrial metabolism via Ca2+ homeostasis remains an open question.

Materials and Methods

Cell culture and antibodies

Hs578T and BT20 human mammary cancer cell lines and HeLa human cervix cell line were cultured in DMEM Glutamax (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin, at 37°C under a 5% CO2 humidified atmosphere.

The following antibodies were used: Bcl-xL (B22630-050, BD), Tubulin (SC-32293, Santa Cruz), Vinculin (SC-55465, Santa Cruz), mouse Flag (F3165, Sigma), rabbit Flag (F7425, Sigma), Calnexin (2679, Cell Signaling), F0F1 ATPase (612518, BD Biosciences).

Plasmid DNA constructs

For the CRISPR Cas9-induced Bcl-xL knockout (KO), single guide RNA targeting Bcl-xL was designed using the MIT CRISPR design tool (http://crispr.mit.edu/). The following guide sequence (5'-CACCGGCAGACAGCCCCGCGGTGAA-3') was cloned in the plentiCRISPRV2 vector[20]. Hs578T and BT20 stable Bcl-xL KO cell lines were generated upon infection with recombinant lentivirus particle containing plentiCRISPRV2_Bcl-xL_guide. Empty vector was used as a control. Cells were selected using 1µg/mL puromycin. Bcl-xL KO was confirmed by western blot.

For rescue experiments, home-made pMX DD Flag Bcl-xL vectors were designed, either containing full length human Bcl-xL sequence (Bcl-xL WT), Bcl-xL fused to ActA or cytochromeB5 transmembrane domain. All constructs were silently mutated in order to be insensitive to Cas9-mediated Bcl-xL KO. Hs578T Bcl-xL KO cell lines were stably infected with pMX DD Bcl-xL constructs and selected using 1µg/mL puromycin and 5µg/mL blasticidin, concomitantly. Expression of the constructs was assessed by western blot, following an overnight treatment with 0,1 µM DD ligand shield1 (Clontech).

siRNA and transfection

siRNA1 (5'-ACCAGGAGAACCACTACATGCAGCC-3') and siRNA2 (5'-GTTCCAGCTCTTTGAAATAGTCTGT-3') both targeting Bcl-xL were purchased from IDT. Scrambled siRNA (All star negative control) was obtained from Qiagen. 48h prior experiment, siRNA were transfected at a final concentration of 5nM using lipofectamine RNAimax reagent (Life technologies), according to the manufacturer instructions.

Single cell tracking experiments

24h before experiment, cells were seeded on a 24 well Essen image lock plate (Essen bioscience). Before incubation in the Incucyte Zoom device, media was replaced by fresh media containing additional reagents where appropriate. Cells were scanned every 30 minutes during 24h, scanning 2

images per well. A movie was generated using Incucyte software and cells were individually hand-tracked in ImageJ using a home-made plugin.

Boyden chamber assay

Prior experiment, cells were grown overnight in a 1% FBS media. The next day, 12 500 cells per well were seeded in a serum-free media on the top compartment of a 96 well 8µm pore Fluoroblock plate (BD Biosciences). 200µL of 10% FBS media was added in the bottom compartment of the plate. Each condition was performed in duplicate. Plate was subsequently incubated during 7h30. At the end of incubation time, media of the lower compartment was replaced by a calcein-containing media for 20min. Fluorescent cells at the bottom of the membrane were pictured using an inverted microscope. The number of cells on each picture was counted with an in house ImageJ plugin.

Zebrafish invasion assay

Zebrafish (crosses between AB and TU strains) were raised according to standard procedures.

Hs578T empty or Bcl-xL KO cell lines were trypsinized from a confluent petri dish. Cells were centrifuged and subsequently washed three times with PBS. Cells were then diluted in PBS to a final concentration of 1 million cells per mL. 500µL of each cellular suspension was incubated at 37°C with 1µL of either DiI (red) or DiO (green) Vybrant dye (Thermofisher Scientific) during 30 min. Cells were regularly mixed during incubation to favor complete labelling of the cell suspension. Labelled cells were finally washed three times with PBS and red and green cell suspensions were mixed together during the second wash step. Cells were resuspended to a final volume of 50µL in culture medium. 24h dechorionated zebrafish embryos were micro-injected in the yolk with the freshly prepared cell suspension. Tricaine (Sigma) was used to anesthetize embryos during the injection. Successful micro-injection was visualized under a fluorescent microscope. Injected zebrafish embryos were incubated two days at 30°C in E3 medium (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM $CaCl_2$, 0.33 mM $MgSO_4$, pH 7.6) supplemented with 30µg/mL 1-phenyl-thiourea (Sigma), in order to inhibit melanin synthesis. 48h post-injection, the number of foci that have escaped the injection site was counted under a confocal inverted microscope Zeiss LSM 780, for each injected fish.

Immunofluorescence

Cells were transfected with an ER-targeted GFP and seeded on a glass coverslip. Cells were then incubated with Mitotracker deep red (Life technologies) for 20min in the incubator, followed by a 20min wash with culture medium in the incubator. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (EMS) during 20min at 37°C. After 3 washes with PBS, cells were permeabilized and saturated in a 0,1% Triton 0,3% BSA PBS solution for 20 min. Cells were subsequently incubated 1h with primary antibody and 1h

with Alexa fluor 563 coupled secondary antibody. Each incubation with the antibodies was followed by three washes with a 0,1% Triton PBS solution. Coverslip were mounted with a Dako mounting medium. Images were acquired using an inverted Zeiss LSM 780 confocal microscope.

Apoptosis assay

3000 cells per well were seeded in a 96-well plate, each condition in triplicate. The next morning, media was replaced by fresh media containing Incucyte Caspase3/7 reagent (Essen Bioscience) and 1µM staurosporine (Sigma) or DMSO. Plate was then incubated in the Incucyte Zoom imaging system and scanned every hour for 24h, scanning one field per well. Images were analysed using Incucyte zoom software and caspase activation was calculated by dividing the number of green counts per image by cell confluence mask.

Subcellular fractionation

Hs578T cells were harvested by trypsination and homogenized in MB buffer (210mM mannitol, 70mM sucrose, 1mM EDTA and 10mM HEPES (pH 7.4) containing protease inhibitors), by shearing with a 1mL syringe and a 26G 5/8 needle 20 times. Correct homogenization was visually assessed under microscope. All subsequent steps were carried out at 4°C. Cell extracts were centrifuged 3 times 10min at 1500g to remove the nuclear fraction. Supernatants were then centrifuged 3 times 10min at 10600g to collect the mitochondrial pellet. The pellet was flushed so as to obtain the MAM and the pure mitochondria fraction, whereas the supernatant was ultracentrifuged 1h at 100 000g. The ER pellet obtained by ultracentrifugation was resuspended in RIPA buffer. Purity of obtained fraction was assessed by western blotting.

Intracellular calcium measurements

For mitochondrial calcium of KO cell lines, pure mitochondria were collected as described above and resuspended in KCl buffer (125mM KCl, 2mM K_2HPO_4, 1mM $MgCl_2$ and 20mM HEPES, pH 7) containing 5µM Oregon green 5N probe. Fluorescence was measured using a Clariostar plate reader (BMG labtech), following 20µM $CaCl_2$ injection. Mitochondrial calcium uptake was evaluated as the decreasing slope of the fluorescence signal.

For mitochondrial calcium of cells loaded with peptides or ER calcium measurements, cells were transfected respectively with cepia-2-mt or Rcepia 1-ER[36] probes 48h prior experiment. Cells were seeded in Labtech chambers and incubated with EM buffer (121mM NaCl; 5,4mM KCl; 2,6mM $MgCl_2$ hexahydrate; 6mM $NaHCO_3$; 5mM D-Glucose; 25mM HEPES; pH 7,3). Fluorescence was quantified with a Zeiss LSM 780 confocal microscope, following 100µM histamine injection.

For cytosolic calcium, 30 000 cells per well were seeded in a 96-well plate the day before the experiment. Next day, cells were loaded with 5µM Fluoforte dye (Enzo) in EM buffer during 45min at 37°C. Fluoforte was washed once with EM buffer and fluorescence was measured using a Clariostar plate reader (BMG labtech), following 100µM histamine injection.

Peptide use

Peptides were obtained from Covalab and resuspended in sterile distilled water to a final concentration of 1mM. Prior experiment, TAT peptides were diluted at 100µM and incubated overnight on bench. On the day of the experiment, cells were washed once with EM buffer and incubated with EM-diluted peptides for 1h in the incubator. Peptides were then washed once with culture medium and cells were used for subsequent experiments.

Gene expression

Gene expression was extracted from data generated by the TCGA Research Network: http://cancergenome.nih.gov/ or from the KM plotter database[37]. Considering the TCGA database, the RSEM normalized expression values were analysed for BCL2 and BCL2L1. Data were available for 1093 breast tumors and 98 healthy adjacent tissus. Among patients 515, 361, 120, 77 and 20 were respectively classified as N0, N1, N2, N3 and Nx. 806 patients were positive for estrogen receptor and 237 were negative.

Statistical analysis

Regarding the genomic analysis, non parametric tests were run to determine the p-value (either Wilcoxon or ANOVA). Kaplan meier representation of the overall survival were plotted and LogRank test were run to determine the p-value. Regarding all other experiments, t.test was performed when comparing two means and ANOVA was used for comparison of three means or more.

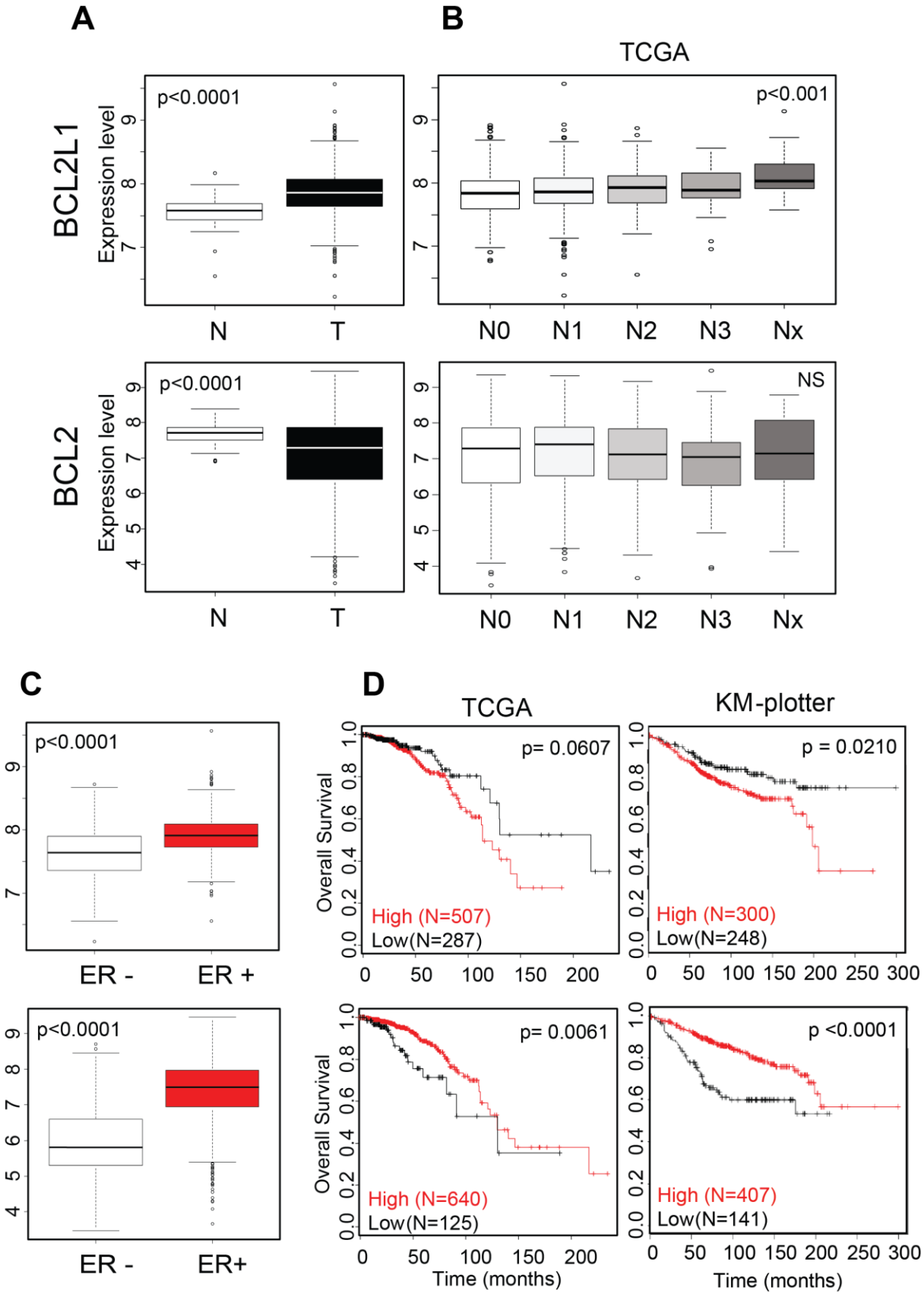
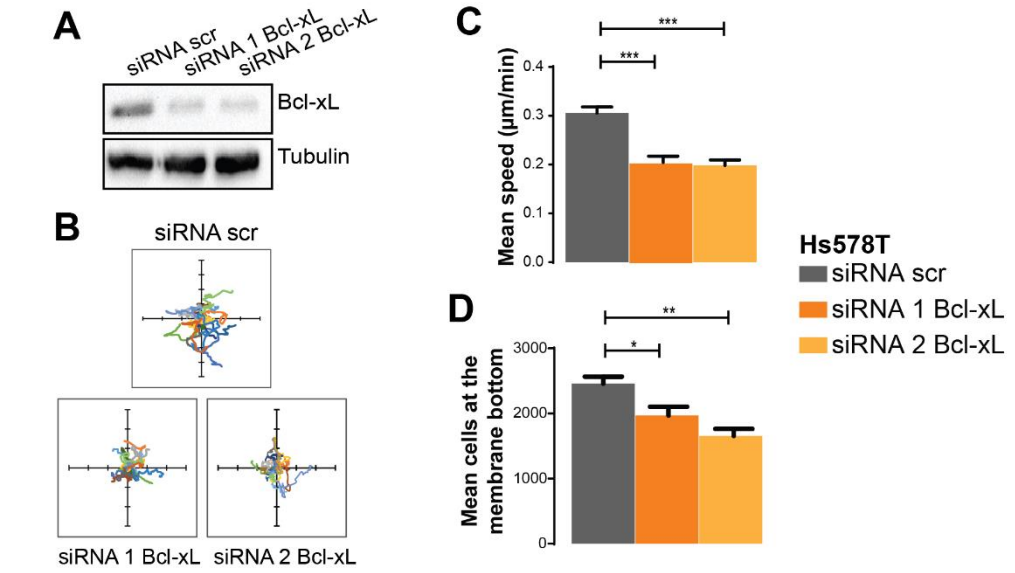

A
B
TCGA
BCL2L1
Expression level
p<0.0001
p<0.001
N
T
N0
N1
N2
N3
Nx
BCL2
p<0.0001
NS
C
D
TCGA
KM-plotter
p<0.0001
ER -
ER +
ER+
Overall Survival
p= 0.0607
p = 0.0210
High (N=507)
Low(N=287)
High (N=300)
Low(N=248)
p= 0.0061
p <0.0001
High (N=640)
Low(N=125)
High (N=407)
Low(N=141)
Time (months)

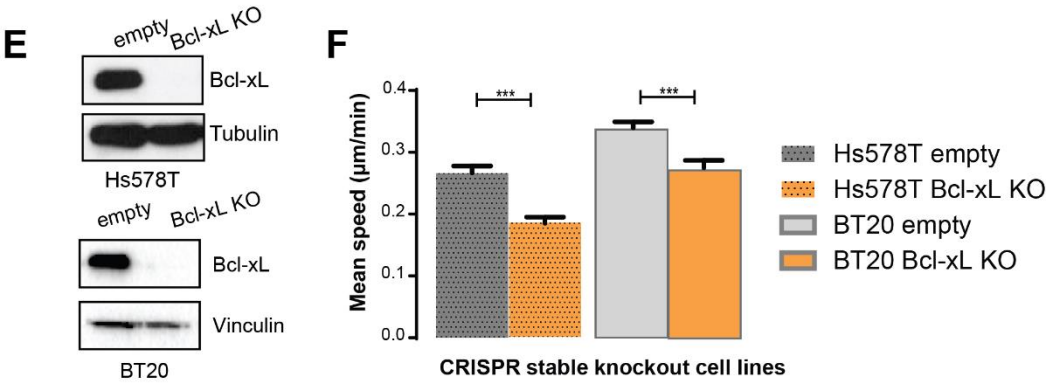
Figure 1. A high level of BCL2L1 expression is indicative of nodes invasion and is of poor prognosis in ER positive patients.

A: Boxplot representation of BCL2L1 (on the top) and BCL2 (on the bottom) expression values in breast tumors of the TCGA database (logarithmic values). The expression of BCL2L1 is increased in tumors (N=1093) versus healthy adjacent tissues (N=98) (on the left).

B: Within tumor a higher expression of BCL2L1 but not of BCL2 is indicative of an increased number of positive lymph nodes (N=1093, on the middle).

C and D. BCL2L1 and BCL2 expression values are higher in ER positive tumors (N=806 ER+ and N=237 ER-) (C) and are respectively indicative of a poorer and better prognosis in ER positive patients (D).


A
siRNA scr
siRNA 1 Bcl-xL
siRNA 2 Bcl-xL
Bcl-xL
Tubulin
B
siRNA scr
siRNA 1 Bcl-xL
siRNA 2 Bcl-xL
C
Mean speed (µm/min)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
***
***
Hs578T
siRNA scr
siRNA 1 Bcl-xL
siRNA 2 Bcl-xL
D
Mean cells at the membrane bottom
3000
2000
1000
0
**
*


E
empty
Bcl-xL KO
Bcl-xL
Tubulin
Hs578T
empty
Bcl-xL KO
Bcl-xL
Vinculin
BT20
F
Mean speed (µm/min)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
***
***
Hs578T empty
Hs578T Bcl-xL KO
BT20 empty
BT20 Bcl-xL KO
CRISPR stable knockout cell lines

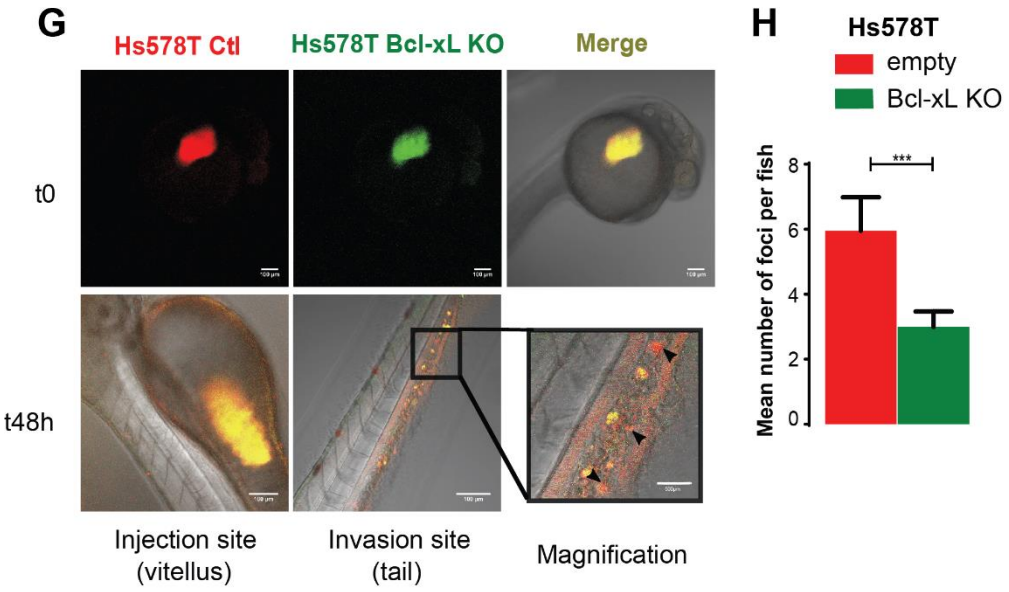

G
Hs578T Ctl
Hs578T Bcl-xL KO
Merge
t0
t48h
Injection site
(vitellus)
Invasion site
(tail)
Magnification
H
Hs578T
empty
Bcl-xL KO
Mean number of foci per fish
8
6
4
2
0
***

Figure 2: Reduced Bcl-xL expression impairs migration of mammary cancer cell lines

A: Efficient siRNA-mediated knockdown of Bcl-xL in Hs578T cells was assessed by Western blot. Tubulin was probed as a load control.

B: Representative trajectories of individual Hs578T cells during a 24h cell tracking experiment. Cells were transfected with siRNAs for 48h and subsequently seeded on an Essen lock 24-well plate. The plate was incubated in the Incucyte Zoom device and one image every 30 minutes was taken during 24h. Each line represents the path of an individual cell, 20 cell trajectories were drawn for each graph. The graphs are representative of 3 experiments.

C: Mean speed of Hs578T cells transfected with either scrambled siRNA (scr) or siRNA targeting Bcl-xL (siRNA1 or 2). Cells were subjected to single cell tracking and cell speed was quantified. Error bars represent the SEM of three independent experiments.

D: Cells were transfected with either scrambled siRNA (scr) or siRNA targeting Bcl-xL (siRNA1 or 2) and Boyden chamber assay was performed. Cells were seeded in the upper compartment in a 1% serum medium and the lower compartment was filled with a 10% serum medium. Plate was incubated for 7,5h and the number of cells at the membrane bottom was counted. Error bars represent the SEM of three independent experiments in which each condition was performed in duplicates.

E: Successful CRISPR-Cas9-mediated KO of Bcl-xL was assessed by Western blot in Hs578T cells (upper panel) and BT20 cells (lower panel). The stable control cell line was infected with the empty vector whereas the stable KO cell line was infected with the vector containing sgRNA targeting Bcl-xL. Tubulin and Vinculin were detected as loading controls.

F: Hs578T (dotted bars) or BT20 (edged bars) cell lines were subjected to single cell tracking experiments and cell speed was quantified. Each KO cell line speed was compared to its empty vector control cell line. Error bars represent the SEM of three independent experiments in which each condition was performed in duplicates.

G: Representative pictures of the zebrafish invasion assay. At t0, equal amount of fluorescently labelled Hs578T empty (red) and Hs578T Bcl-xL KO (green) cells was injected into the yolk of 24h-aged zebrafish embryos. Embryos were then incubated at 30°C for 48h and the fluorescent cell foci that had escaped the injection site were counted under a fluorescent microscope. Invading cell foci were mostly observed in the embryos' tail. Scale bar: 100µm, except for the magnification picture were scale bar represents 500µm.

H: Mean number of cell foci that have escaped the injection site. Error bars represent the SEM of four independent experiments.

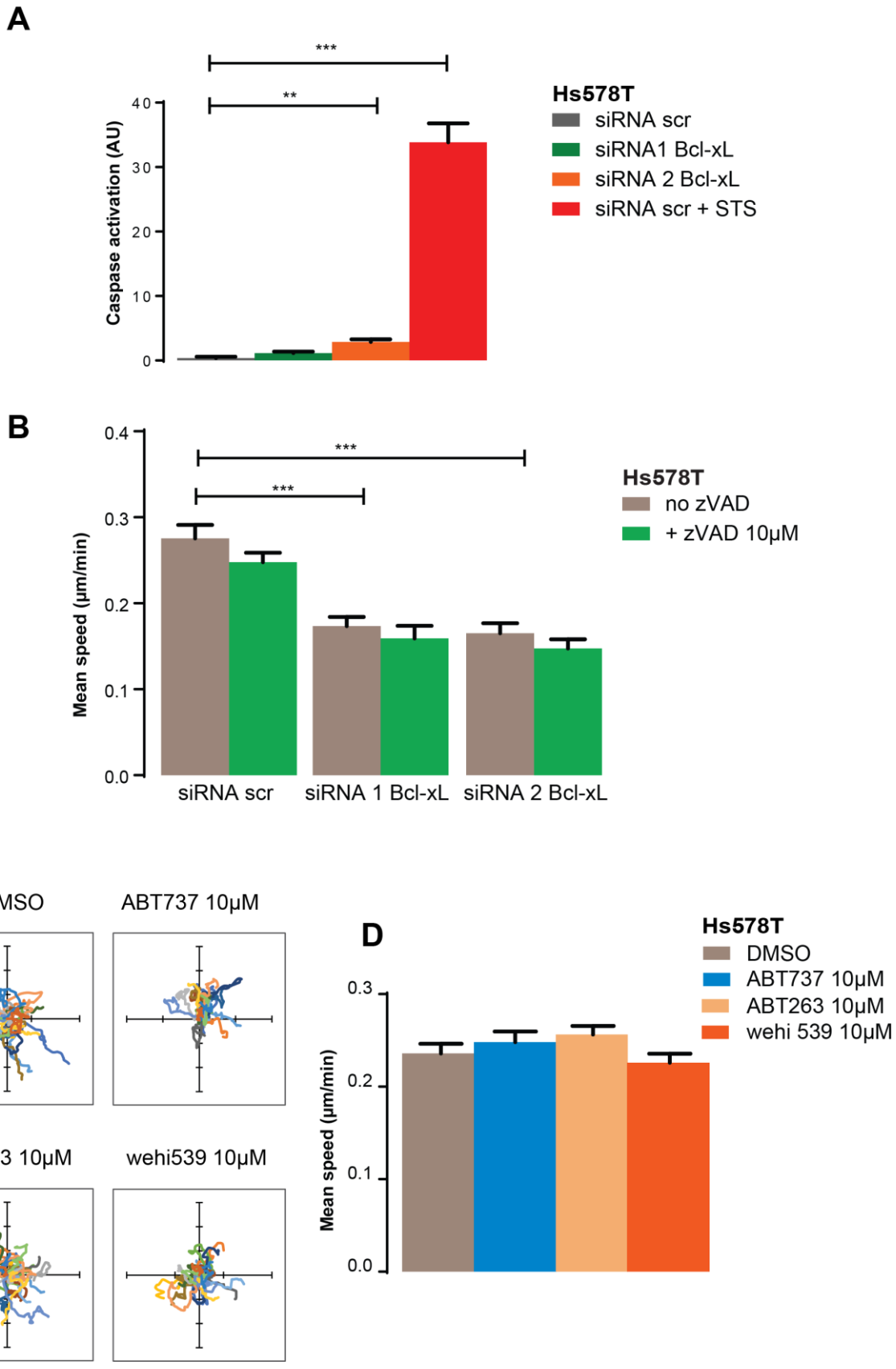

A
***
**
Caspase activation (AU)
40
30
20
10
0
Hs578T
siRNA scr
siRNA1 Bcl-xL
siRNA 2 Bcl-xL
siRNA scr + STS
B
***
***
Mean speed (µm/min)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
siRNA scr
siRNA 1 Bcl-xL
siRNA 2 Bcl-xL
Hs578T
no zVAD
+ zVAD 10µM
C
DMSO
ABT737 10µM
ABT263 10µM
wehi539 10µM
D
Mean speed (µm/min)
0.3
0.2
0.1
0.0
Hs578T
DMSO
ABT737 10µM
ABT263 10µM
wehi 539 10µM

Figure 3: Bcl-xL control of cell migration is independent of its anti-apoptotic activity

A: Caspase activation was measured in Hs578T cells transfected with siRNA control (scr) or siRNAs targeting Bcl-xL. Transfected cells were incubated with the Caspase 3/7 probe (Essen) which emits green fluorescence when caspases are activated. Cells were incubated in the Incucyte Zoom device and mean caspase activation was quantified using Incucyte software after 9h incubation. Cells transfected with control siRNA and incubated with 1µM staurosporine (STS) were used as a positive control. Each condition was performed in triplicate and error bars represent the SEM of three independent experiments.

B: Hs578T cells transfected with siRNA control (scr) or siRNAs targeting Bcl-xL were subjected to single cell tracking experiments in the presence (zVAD 10µM) or in the absence (no zVAD) of the pan-caspase inhibitor zVAD-fmk at 10µM. Mean cell speed was quantified for each condition. Each condition was performed in duplicate and the error bars represent the SEM of three independent experiments.

C: Representative trajectories of individual Hs578T cells during a 24h cell tracking experiment. Hs578T cells were seeded on an Essen lock 24-well plate. Before incubating the plate in the IncuCyte Zoom device, cells were treated with 10µM of BH3-mimetics (ABT737, ABT263 and wehi539) or with the vehicle (dmso). Each line represents the path of an individual cell. 20 cell trajectories were drawn for each graph. The graphs are representative of 3 experiments.

D: Mean speed of Hs578T cells treated with 10µM BH3-mimetics (ABT737, ABT263 and wehi539) or with the vehicle (dmso). Cells were subjected to single cell tracking and cell speed was quantified. Each condition was performed in duplicate. Error bars represent the SEM of three independent experiments.

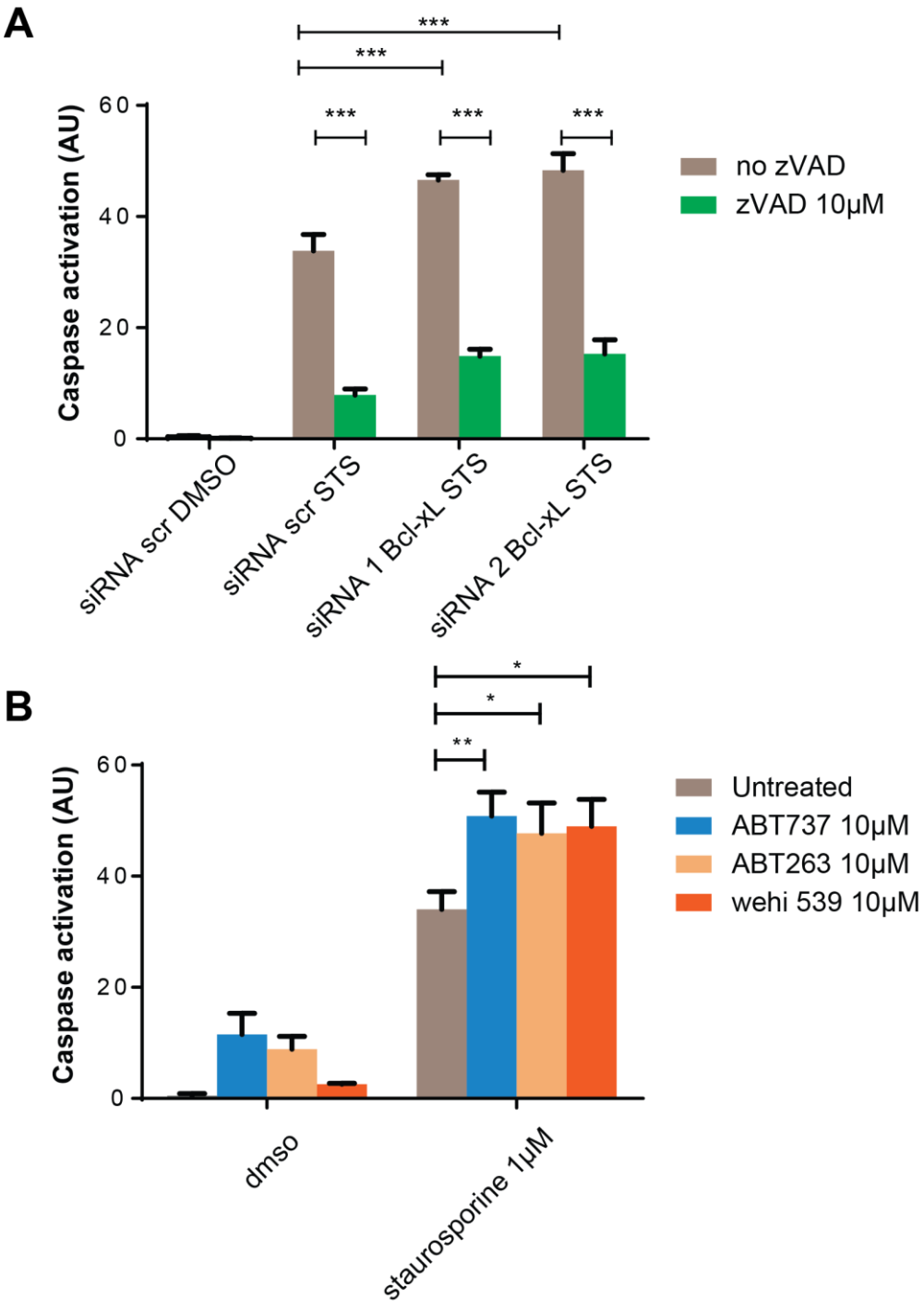

A
***
***
***
***
***
Caspase activation (AU)
60
40
20
0
siRNA scr DMSO
siRNA scr STS
siRNA 1 Bcl-xL STS
siRNA 2 Bcl-xL STS
no zVAD
zVAD 10µM
B
*
*
**
Caspase activation (AU)
60
40
20
0
dmso
staurosporine 1µM
Untreated
ABT737 10µM
ABT263 10µM
wehi 539 10µM

Figure S1 relative to Figure 3

A: Hs578T cells were transfected with siRNA control (scr) or siRNAs targeting Bcl-xL. Cells were incubated with the Caspase 3/7 fluorescent probe. Cells were treated with 1µM staurosporine (STS) or with the vehicle (dmso). Finally, cells were either incubated with 10µM zVAD-fmk (zVAD) or with the vehicle (no zVAD). Cells were incubated in the Incucyte Zoom device and mean caspase activation was quantified using Incucyte software after 9h incubation. Each condition was performed in triplicate and error bars represent the SEM of three independent experiments.

B: Hs578T cells were treated with 1µM staurosporine (STS) or with the vehicle (dmso) and incubated with the Caspase 3/7 fluorescent probe. Cells were treated with 10µM BH3-mimetics (ABT737, ABT263 and wehi539) or with the vehicle (untreated). Cells were then incubated in the Incucyte Zoom device and mean caspase activation was quantified using Incucyte software after 9h incubation. Each condition was performed in triplicate and error bars represent the SEM of three independent experiments.

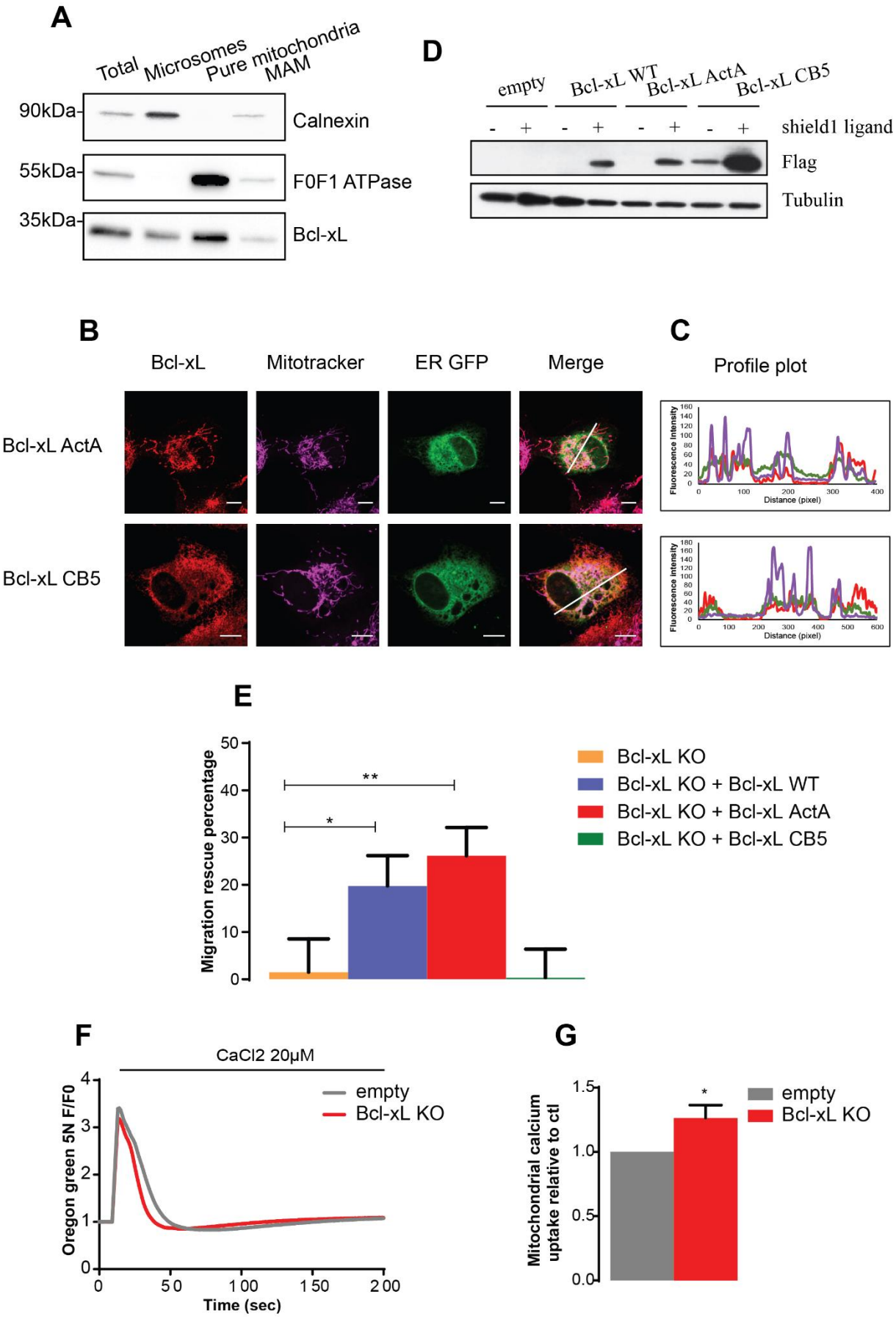

A
Total
Microsomes
Pure mitochondria
MAM
90kDa
Calnexin
55kDa
F0F1 ATPase
35kDa
Bcl-xL
D
empty
Bcl-xL WT
Bcl-xL ActA
Bcl-xL CB5
- + - + - + - +
shield1 ligand
Flag
Tubulin
B
Bcl-xL
Mitotracker
ER GFP
Merge
Bcl-xL ActA
Bcl-xL CB5
C
Profile plot
Fluorescence intensity
Distance (pixel)
E
Migration rescue percentage
**
*
Bcl-xL KO
Bcl-xL KO + Bcl-xL WT
Bcl-xL KO + Bcl-xL ActA
Bcl-xL KO + Bcl-xL CB5
F
CaCl2 20µM
empty
Bcl-xL KO
Oregon green 5N F/F0
Time (sec)
G
Mitochondrial calcium uptake relative to ctl
*
empty
Bcl-xL KO

Figure 4: The mitochondrial but not the ER-targeted Bcl-xL rescues cell migration

A: Localization of endogenous Bcl-xL in Hs578T cells was assessed by subcellular fractionation. Four fraction were obtained: the initial fraction (total), the 100000g pellet (microsomes), the 10600g pellet (pure mitochondria) and the fraction flushed from the 10600g pellet (MAM-Mitochondria Associated Membrane). Bcl-xL was detected in Western blot, as well as Calnexin (ER marker) and F0F1 ATPase (mitochondrial marker).

B: Localization of Bcl-xL constructs was verified by immunofluorescence. Prior experiment, expression of DD-Bcl-xL ActA (mitochondrial) or DD-Bcl-xL CB5 (ER-targeted) constructs were induced overnight using 0,1µM shield1 ligand in stable Hs578T cell lines. Bcl-xL constructs were immune-stained using an anti-Bcl-xL antibody. Mitochondria was stained with Mitotracker deep red and for ER visualization, cells were transfected with an ER-targeted GFP. Scale bar: 10µm

C: Profile plot of fluorescence signals. Fluorescence intensity along the white segments of the merge pictures (Figure 4B) was quantified using ImageJ software.

D: Expression of inducible Bcl-xL constructs in Hs578T Bcl-xL KO cell lines was verified by Western blot. Prior experiment, expression of DD-Flag-Bcl-xL constructs was induced in each stable cell line, by treating cells with 0,1µM shield1 ligand overnight. The next morning, cell lysates were collected and subjected to western blotting. Tubulin was used as a load control.

E: Stable Hs578T cell lines were subjected to single cell tracking experiment, with or without treatment with 0,1µM shield1 ligand. Each condition was performed in duplicate and cell speed was quantified. For each cell line, migration rescue percentage was calculated as the variation of cell speed between cells treated with the ligand (ie expressing the construct) and untreated cells from the same cell line (ie not expressing the construct). Each percentage was then compared to the control cell line (Bcl-xL KO + empty vector, in yellow).

F: Representative traces of fluorescent Oregon green 5N probe. Mitochondria of Hs578T control (empty) or Bcl-xL KO cell lines were isolated by subcellular fractionation. Mitochondria were then incubated in an Oregon grenn 5N-containing media in a microplate. Fluorescence was read in a BMG labtech microplate reader before and after injection of $CaCl_2$ in the medium. Traces are representative of three independent experiments.

G: Mitochondrial calcium uptake of Hs578T control (empty) or Bcl-xL KO cell lines was calculated as the decreasing slope of fluorescence traces, such as the one represented in Figure 4F. Values obtained for the control cell line were normalized to 1. Error bar represents the SEM of three independent experiments.

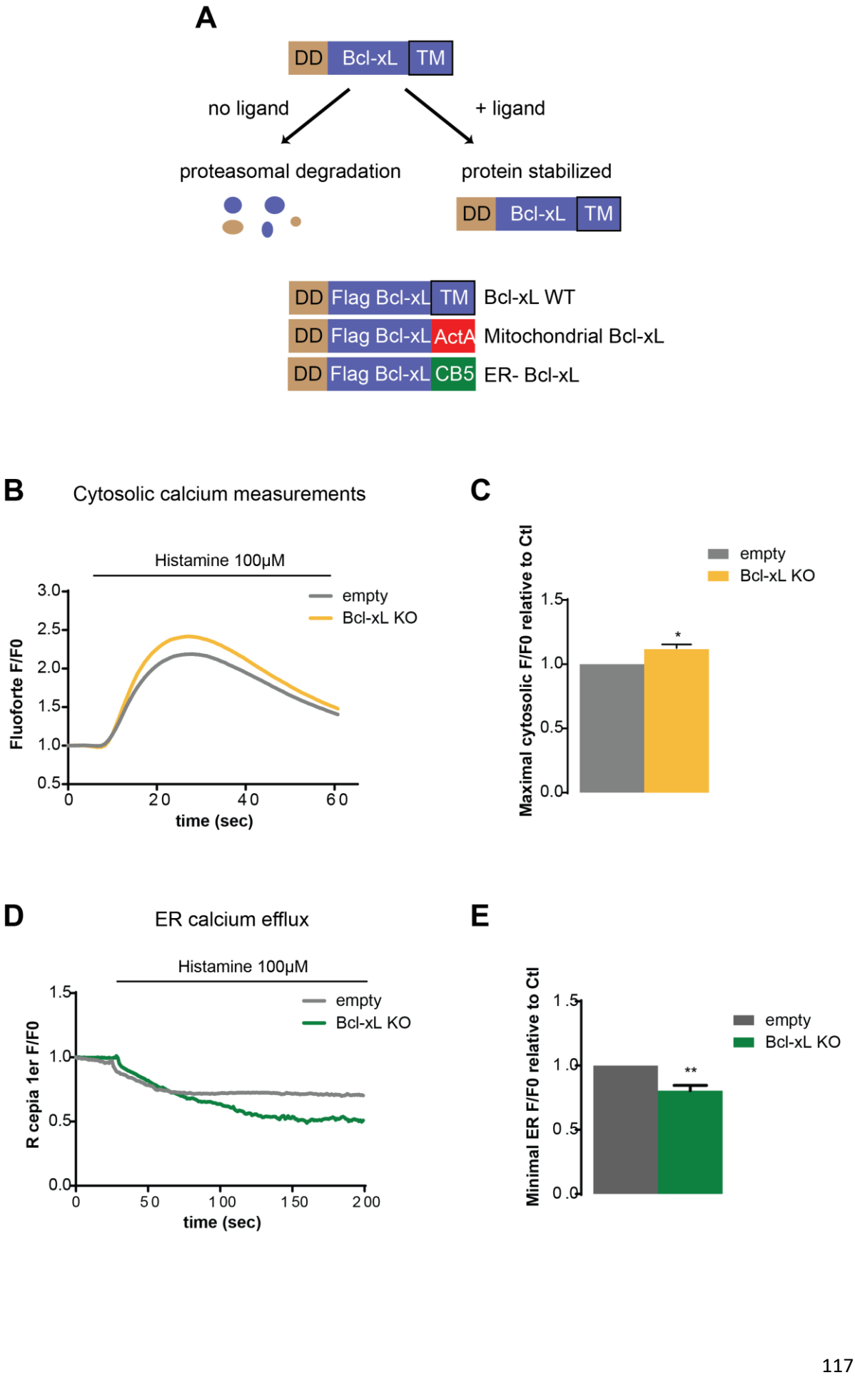

A
DD
Bcl-xL
TM
no ligand
+ ligand
proteasomal degradation
protein stabilized
DD
Bcl-xL
TM
DD
Flag Bcl-xL
TM
Bcl-xL WT
DD
Flag Bcl-xL
ActA
Mitochondrial Bcl-xL
DD
Flag Bcl-xL
CB5
ER- Bcl-xL
B
Cytosolic calcium measurements
Histamine 100µM
empty
Bcl-xL KO
Fluoforte F/F0
time (sec)
C
empty
Bcl-xL KO
Maximal cytosolic F/F0 relative to Ctl
D
ER calcium efflux
Histamine 100µM
empty
Bcl-xL KO
R cepia 1er F/F0
time (sec)
E
empty
Bcl-xL KO
Minimal ER F/F0 relative to Ctl

Figure S2 relative to Figure 4

A: Rationale for the ProteoTuner inducible system. The protein of interest is fused to a destabilization domain (DD). In the absence of its ligand, the DD targets the protein to the proteasome and thus the construct isn't expressed. When shield1 ligand is added, it stabilizes the DD and the construct is fully expressed in the cells.

B: Representative response curve of Hs578T control (empty) or Bcl-xL KO cell lines loaded with cytosolic probe Fluoforte (Enzo). Fluorescence was measured in a microplate reader before and after histamine injection.

C: Maximal amplitude of cytosolic fluorescence signal of Hs578T control (empty) or Bcl-xL KO cell lines loaded with cytosolic probe Fluoforte. Each condition was performed in six replicates and the error bars represent the SEM of three independent experiments.

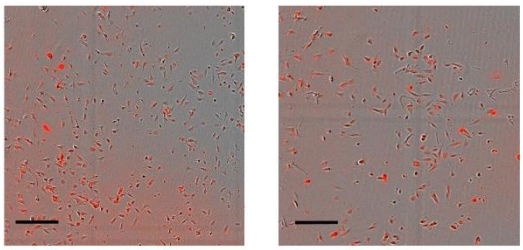
D: Representative response curve of Hs578T control (empty) or Bcl-xL KO cell lines transfected with ER probe R-cepia 1ER. Fluorescence was measured under a confocal microscope before and after histamine injection.

E: Minimal ER fluorescence signal of of Hs578T control (empty) or Bcl-xL KO cell lines transfected with ER probe R-cepia 1ER. Measurements were performed on at least 40 cells per condition and the error bars represent the SEM of three independent experiments.

A

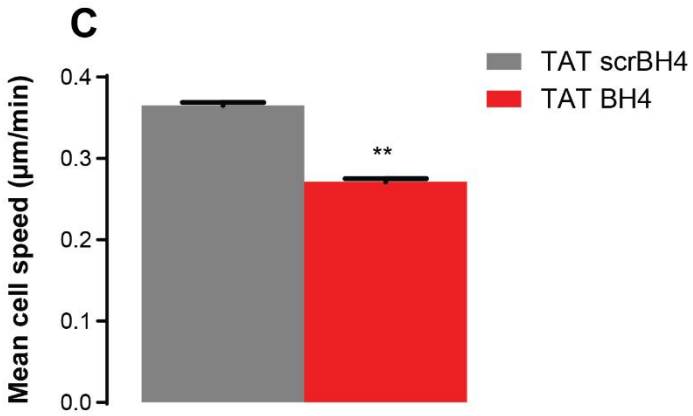
Peptide name	Sequence
TAT BH4	**TAT**-MSQSNRELVVDFLSYKLSQKGYSW
TAT ScrBH4	**TAT**-WYSKQRSLSGLVMYVLEDKNSQFS

B

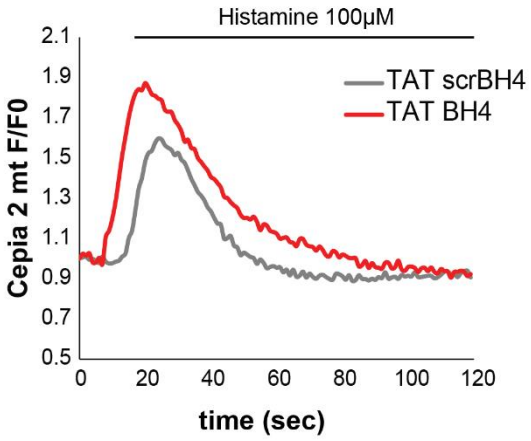


Hs578T + TAT scrBH4 Hs578T + TAT BH4

C



D



E

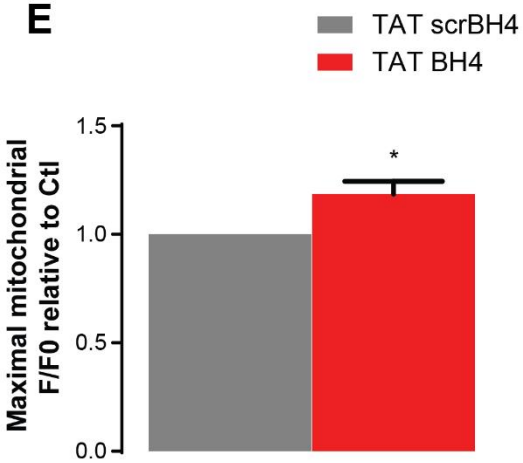


Figure 5: The BH4 domain of Bcl-xL controls cell migration

A: Table recapitulating the sequences of the TAT peptides used in this study.

B: Hs578T cells were loaded with 5µM of either TAT BH4 or TAT scrBH4 fluorescent peptides. Penetrance of the peptides was assessed by visualizing fluorescent cells. Scale bar: 200µm.

C: Hs578T cells loaded with 5µM of either TAT BH4 or TAT scrBH4 fluorescent peptides were subjected to single cell tracking experiment. Each condition was performed in duplicate and cell speed was quantified. Error bars represent the SEM of three independent experiments.

D: Representative response curve of Hs578T cells loaded with 5µM of either TAT BH4 or TAT scr BH4 peptides. 48h prior experiment cells were transfected with the fluorescent mitochondrial probe cepia 2 mt. Fluorescence was measured under a confocal microscope before and after histamine injection.

E: Maximal mitochondrial fluorescence signal relative to control of Hs578T cells loaded with TAT BH4 or TAT scr BH4 peptides (5µM) and transfected with mitochondrial probe cepia 2 mt. Measurements were performed on at least 40 cells per condition and the error bars represent the SEM of three independent experiments.

References

1. Youle, R. J. & Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 47–59 (2008).

2. Lopez, J. & Tait, S. W. G. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. Br. J. Cancer 112, 957–962 (2015).

3. Bonneau, B., Prudent, J., Popgeorgiev, N. & Gillet, G. Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: the calcium connection. Biochim. Biophys. Acta 1833, 1755–1765 (2013).

4. Prudent, J. et al. Bcl-wav and the mitochondrial calcium uniporter drive gastrula morphogenesis in zebrafish. Nat. Commun. 4, 2330 (2013).

5. Li, C. et al. Apoptosis regulation by Bcl-x(L) modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel isoform gating. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 12565–12570 (2007).

6. White, C. et al. The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R. Nat. Cell Biol. 7, 1021–1028 (2005).

7. Huang, H. et al. An interaction between Bcl-xL and the voltage-dependent anion channel (VDAC) promotes mitochondrial Ca2+ uptake. J. Biol. Chem. 288, 19870–19881 (2013).

8. Vander Heiden, M. G. et al. Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. J. Biol. Chem. 276, 19414–19419 (2001).

9. Karczmarek-Borowska, B. et al. Estimation of prognostic value of Bcl-xL gene expression in non-small cell lung cancer. Lung Cancer Amst. Neth. 51, 61–69 (2006).

10. Watanabe, J. et al. Bcl-xL overexpression in human hepatocellular carcinoma. Int. J. Oncol. 21, 515–519 (2002).

11. Olopade, O. I. et al. Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. Cancer J. Sci. Am. 3, 230–237 (1997).

12. Martin, S. S. et al. A cytoskeleton-based functional genetic screen identifies Bcl-xL as an enhancer of metastasis, but not primary tumor growth. Oncogene 23, 4641–4645 (2004).

13. Fernández, Y., España, L., Mañas, S., Fabra, A. & Sierra, A. Bcl-xL promotes metastasis of breast cancer cells by induction of cytokines resistance. Cell Death Differ. 7, 350–359 (2000).

14. Keitel, U. et al. Bcl-xL mediates therapeutic resistance of a mesenchymal breast cancer cell subpopulation. Oncotarget 5, (2014).

15. Hager, J. H., Ulanet, D. B., Hennighausen, L. & Hanahan, D. Genetic ablation of Bcl-x attenuates invasiveness without affecting apoptosis or tumor growth in a mouse model of pancreatic neuroendocrine cancer. PloS One 4, e4455 (2009).

16. Du, Y.-C. N., Lewis, B. C., Hanahan, D. & Varmus, H. Assessing tumor progression factors by somatic gene transfer into a mouse model: Bcl-xL promotes islet tumor cell invasion. PLoS Biol. 5, e276 (2007).

17. Hwang, K.-T. et al. Prognostic influence of BCL2 expression in breast cancer. Int. J. Cancer J. Int. Cancer 131, E1109-1119 (2012).

18. Neve, R. M. et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer Cell 10, 515–527 (2006).

19. Schmitt, E., Beauchemin, M. & Bertrand, R. Nuclear colocalization and interaction between bcl-xL and cdk1(cdc2) during G2/M cell-cycle checkpoint. Oncogene 26, 5851–5865 (2007).

20. Ran, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat. Protoc. 8, 2281–2308 (2013).

21. Teng, Y. et al. Evaluating human cancer cell metastasis in zebrafish. BMC Cancer 13, 453 (2013).

22. Oltersdorf, T. et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. Nature 435, 677–681 (2005).

23. Lessene, G. et al. Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor. Nat. Chem. Biol. 9, 390–397 (2013).

24. Eno, C. O. et al. Distinct roles of mitochondria- and ER-localized Bcl-xL in apoptosis resistance and Ca2+ homeostasis. Mol. Biol. Cell 23, 2605–2618 (2012).

25. Bonneau, B. et al. The Bcl-2 homolog Nrz inhibits binding of IP3 to its receptor to control calcium signaling during zebrafish epiboly. Sci. Signal. 7, ra14 (2014).

26. Banaszynski, L. A., Chen, L., Maynard-Smith, L. A., Ooi, A. G. L. & Wandless, T. J. A Rapid, Reversible, and Tunable Method to Regulate Protein Function in Living Cells Using Synthetic Small Molecules. Cell 126, 995–1004 (2006).

27. Prevarskaya, N., Skryma, R. & Shuba, Y. Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. Nat. Rev. Cancer 11, 609–618 (2011).

28. Monaco, G. 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. (2015). doi:10.1074/jbc.M114.622514

29. Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T. & Tsujimoto, Y. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 3100–3105 (2000).

30. González-García, M. et al. bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. Dev. Camb. Engl. 120, 3033–3042 (1994).

31. Johnson, B. W., Cepero, E. & Boise, L. H. Bcl-xL inhibits cytochrome c release but not mitochondrial depolarization during the activation of multiple death pathways by tumor necrosis factor-alpha. J. Biol. Chem. 275, 31546–31553 (2000).

32. Choi, S. et al. Bcl-xL promotes metastasis independent of its anti-apoptotic activity. Nat. Commun. 7, 10384 (2016).

33. Prudent, J., Popgeorgiev, N., Bonneau, B. & Gillet, G. Bcl-2 proteins, cell migration and embryonic development: lessons from zebrafish. Cell Death Dis. 6, e1910 (2015).

34. Popgeorgiev, N. et al. The apoptotic regulator Nrz controls cytoskeletal dynamics via the regulation of Ca2+ trafficking in the zebrafish blastula. Dev. Cell 20, 663–676 (2011).

35. Fouqué, A. et al. The apoptotic members CD95, BclxL, and Bcl-2 cooperate to promote cell migration by inducing Ca(2+) flux from the endoplasmic reticulum to mitochondria. Cell Death Differ. 23, 1702–1716 (2016).

36. Suzuki, J. et al. Imaging intraorganellar Ca2+ at subcellular resolution using CEPIA. Nat. Commun. 5, 4153 (2014).

37. Szász, A. M. et al. Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1,065 patients. Oncotarget 7, 49322–49333 (2016).

Présentation article n°2

Mito-priming as a method to engineer Bcl-2 addiction

Certaines cellules cancéreuses sont dites « amorcées à mourir » : elles expriment une grande quantité de protéines Bcl-2 pro-apoptotiques mais résistent à la mort cellulaire par surexpression de protéines Bcl-2 anti-apoptotiques. Ainsi, il est possible de déplacer cet équilibre en faveur de l'induction de l'apoptose, en traitant ces cellules avec des composés BH3-mimétiques. En effet, les BH3-mimétiques entrent en compétition avec les Bcl-2 pro-apoptotiques pour la liaison avec les Bcl-2 anti-apoptotiques. En conséquence, les molècules pro-apoptotiques endogènes sont libérées et peuvent induire la perméabilisation mitochondriale.

Dans ce travail, nous avons développé un système permettant de mimer les propriétés des cellules amorcées à mourir. Pour cela, nous avons co-exprimé dans plusieurs lignées cellulaires une protéine BH3-only activatrice (tBid, Bim ou Puma) avec une protéine anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-xL ou Mcl-1) en quantité égale. Les cellules ont, pour ce faire, été infectées avec un plasmide codant pour chaque partenaire et comprenant, entre les ORF de chaque protéine, une séquence 2A. Cette séquence d'origine virale a la propriété de s'auto-cliver une fois traduite, permettant la libération de la protéine pro-apoptotique et de la protéine anti-apoptotique dans le cytosol. Les cellules deviennent alors amorcées à mourir : il suffit de les traiter avec un BH3-mimétique ciblant la protéine anti-apoptotique exogène pour induire la perméabilisation mitochondriale et l'apoptose (**Figure 29**).

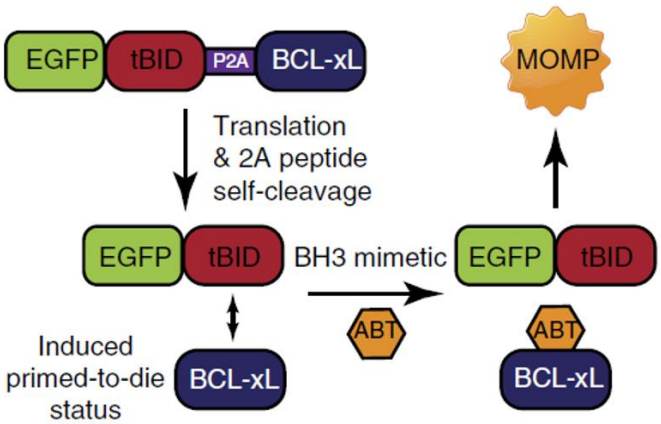


Figure 29: Principe de la méthode "Mito-priming"

Un plasmide codant pour une ORF EGFP-tBid_2A_Bcl-xL est exprimé dans les cellules. Après traduction de la pré-protéine, la séquence 2A s'auto-clive et la construction donne deux protéines disctinctes : EGFP-tBid et Bcl-xL. A ce stade, la cellule est vivante, car Bcl-xL inhibe EGFP-tBid, mais amorcée à mourir. Par traitement avec l'ABT737 qui cible Bcl-xL, EGFPtBid est libérée et provoque la perméabilisation mitochondriale (MOMP). Extrait de (Lopez et al., 2016).

Nous avons montré que ce système est utilisable dans plusieurs types cellulaires (SVEC, HeLa, MEF imortalisées et 3T3) et engendre l'apoptose de façon dose-dépendante vis-à-vis de la concentration en BH3-mimétique. De plus, nous avons vérifié que l'apoptose est effectivement dépendante de GFPtBid, puisque les cellules stables infectées avec une construction comprenant une forme inactive de tBid (tBidG94E) ne meurent pas suite aux traitements avec l'ABT737.

En changeant de protéine anti-apoptotique au sein du système, on peut générer des lignées cellulaires spécifiquement dépendantes de Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1. Ces lignées se révèlent très intéressantes pour tester l'efficacité des composés BH3-mimétiques. Par exemple, la lignée cellulaire dépendante de Bcl-xL meurt par traitement avec de l'ABT737 ou avec les BH3-mimétiques spécifiques de Bcl-xL wehi539, A-1155463 ou A-1331852. En revanche, cette lignée ne meurt pas sous l'effet du traitement avec l'ABT199, composé ciblant uniquement Bcl-2.
De plus, l'utilisation d'un tel système permet de comparer l'efficacité de BH3-mimétiques ciblant la même protéine anti-apoptotique. Ainsi, le composé A-1210477 est plus efficace que le composé UMI-77 pour induire l'apoptose dans la lignée dépendante de Mcl-1.

En dernier lieu, nous avons utilisé le système de mito-priming pour étudier les interactions entre protéines de la famille Bcl-2. En exprimant les constructions tBid-2A-Bcl-xL, Bim-2A-Bcl-xL et Puma-2A-Bcl-xL dans des lignées cellulaires KO pour Bax ou Bak, nous observons que tBid et Puma activent préférentiellement Bak, conformément à ce qui avait été précédemment rapporté pour tBid (Sarosiek et al., 2013). Cette préférence d'activation s'explique par des spécificités au niveau du domaine BH3, puisque qu'une protéine recombinante tBid ou Puma pour laquelle on remplace le domaine BH3 par celui de Bim ne montre plus de préférence d'activation pour Bak.

En conclusion, le système mito-priming est un système robuste et efficace qui permet d'induire la perméabilisation mitochondriale de façon très contrôlée. De ce fait, ce système est bien adapté pour étudier les modalités d'induction de cette perméabilisation. Il s'agit également d'un outil intéressant pour cribler de nouvelles molécules ciblant les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques.

Article n°2

Mito-priming as a method to engineer Bcl-2 addiction

Jonathan Lopez, Margaux Bessou, Joel S. Riley, Evangelos Giampazolias, Franziska Todt, Tony Rochegüe, Andrew Oberts, Douglas R. Green, Frank Edlich, Gabriel Ichim, Stephen W. G. Tait.

Publié dans Nature communications, février 2016. Doi :10.1038/ncomms10538

nature COMMUNICATIONS

ARTICLE

Received 5 Jun 2015 | Accepted 23 Dec 2015 | Published 2 Feb 2016

DOI: 10.1038/ncomms10538 OPEN

Mito-priming as a method to engineer Bcl-2 addiction

Jonathan Lopez[1,2,†], Margaux Bessou[1,2,*,†], Joel S. Riley[1,2,*], Evangelos Giampazolias[1,2], Franziska Todt[3], Tony Rochegüe[1,2,†], Andrew Oberst[4], Douglas R. Green[5], Frank Edlich[3,6], Gabriel Ichim[1,2] & Stephen W.G. Tait[1,2]

Most apoptotic stimuli require mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) in order to execute cell death. As such, MOMP is subject to tight control by Bcl-2 family proteins. We have developed a powerful new technique to investigate Bcl-2-mediated regulation of MOMP. This method, called mito-priming, uses co-expression of pro- and anti-apoptotic Bcl-2 proteins to engineer Bcl-2 addiction. On addition of Bcl-2 targeting BH3 mimetics, mito-primed cells undergo apoptosis in a rapid and synchronous manner. Using this method we have comprehensively surveyed the efficacy of BH3 mimetic compounds, identifying potent and specific MCL-1 inhibitors. Furthermore, by combining different pro- and anti-apoptotic Bcl-2 pairings together with CRISPR/Cas9-based genome editing, we find that tBID and PUMA can preferentially kill in a BAK-dependent manner. In summary, mito-priming represents a facile and robust means to trigger mitochondrial apoptosis.

[1] Cancer Research UK Beatson Institute, Switchback Road, Glasgow G61 1BD, UK. [2] Institute of Cancer Sciences, University of Glasgow, Garscube Estate, Switchback Road, Glasgow G61 1BD, UK. [3] Institute for Biochemistry and Molecular Biology, ZBMZ, Faculty of Medicine, University of Freiburg, 79104 Freiburg, Germany. [4] Department of Immunology, University of Washington, Campus Box 358059, 750 Republican Street, Seattle, Washington, USA. [5] Department of Immunology, St Jude Children's Research Hospital, 262 Danny Thomas Place, Memphis, Tennessee 38105, USA. [6] BIOSS, Centre for Biological Signaling Studies, University of Freiburg, 79104 Freiburg, Germany. * These authors contributed equally to this work. † Present addresses: University of Lyon, Cancer Research Centre of Lyon, U1052 INSERM, UMS 3453 CNRS, Lyon I University, Léon Bérard Centre, Lyon, France (J.L. or M.B.); École Supérieure de Biologie-Biochimie-Biotechnologies, Université catholique de Lyon, Lyon, France (T.R.). Correspondence and requests for materials should be addressed to S.W.G.T. (email: stephen.tait@glasgow.ac.uk).

Following most apoptotic stimuli, mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) is essential for cell death. MOMP leads to the release of mitochondrial intermembrane space proteins such as cytochrome *c* that activate caspase proteases causing rapid cell death[1]. However, even in the absence of caspase activity, MOMP typically kills cells and therefore represents a point-of-no-return[2]. Given this pivotal role in dictating life and death, MOMP is highly regulated, primarily by pro- and anti-apoptotic members of the Bcl-2 protein family[3].

Evasion from apoptosis is considered a hallmark of cancer[4]. Paradoxically, while apoptotic inhibition promotes cancer, tumour cells often display increased apoptotic sensitivity relative to normal tissue. Underlying this increased sensitivity, are altered levels of pro- and anti-apoptotic Bcl-2 proteins. Due to the pro-apoptotic stresses that cancer cells encounter, anti-apoptotic Bcl-2 function is required for cell survival to counteract pro-apoptotic BH3-only protein function. Cancer cells in this state are termed 'primed-to-die' and are sensitive to apoptosis-inducing therapies[5,6]. Importantly, targeted anti-cancer therapies called BH3 mimetics have recently been developed to exploit this Bcl-2 dependency. In a manner similar to BH3-only proteins, BH3 mimetics bind to and inhibit anti-apoptotic Bcl-2 function[7].

Due to the wide-ranging roles of apoptosis in health and disease, the regulation of MOMP by Bcl-2 proteins has been intensively studied. Nevertheless, methods to investigate mitochondrial apoptosis are complicated by commonly used treatments, such as staurosporine, that induce MOMP over many hours, in an asynchronous manner and often with off-target, non-MOMP-dependent effects. Current methods to 'cleanly' induce mitochondrial apoptosis include ER/tamoxifen or doxycycline-based induction of BH3-only protein activity[8–11]. However, these approaches remain far from ideal due to various factors that include low potency, lack of general applicability, extended time of induction and, in some cases, direct effects of the chemical inducer on mitochondrial function[12]. Circumventing these problems, our aim was to develop a technique that would rapidly and synchronously induce apoptosis over a cellular population in an effective manner. Ideally, such an approach would be applicable to any cell of choice. A second criterion was that any technique should also permit investigation of Bcl-2-mediated regulation of MOMP, for example allowing investigation of BH3-only protein specificity for the executioner proteins BAX or BAK.

With these goals in mind, we chose to mimic primed-to-die cancer cells through a method we call 'mito-priming'. We reasoned that co-expression of pro- and anti-apoptotic Bcl-2 proteins should render cells highly sensitive to the addition of BH3 mimetic compounds (Fig. 1a). Bcl-2/BH3-only protein complexes are highly dynamic; therefore, we predicted that addition of BH3 mimetics that compete for Bcl-2 binding would free sufficient BH3-only proteins to activate BAX/BAK, leading to MOMP and to cell death. Our expectation was that mito-priming should permit engineering of Bcl-2 addiction to any cell-type. Indeed, we find that mito-priming is a potent and generally applicable method to induce mitochondrial apoptosis in a clean and controllable manner. Furthermore, mito-priming represents a robust means of interrogating functional relationships within the Bcl-2 family network. We highlight the utility of this method to compare the potency and selectivity of available BH3 mimetics and to identify selective requirements for the proapoptotic effectors BAX and BAK in BH3-only protein driven apoptosis.

Results

Mito-priming permits rapid induction of apoptosis. In the mito-priming method, we predicted that co-expression of pro- and anti-apoptotic Bcl-2 proteins should enforce a Bcl-2 survival dependency on cells (Fig. 1a). To test this, the BH3-only protein tBID (fused to GFP) was expressed together with anti-apoptotic BCL-xL, using a 2A self-cleaving peptide sequence to enable equimolar co-expression[13]. SVEC cells stably expressing GFP–tBID 2A BCL-xL were generated by retroviral transduction and flow-cytometry-based cell sorting. Western blot analysis verified expression of both GFP–tBID and BCL-xL, and confocal microscopy demonstrated mitochondrial localization of GFP–tBID, which was confirmed by a high Pearson's co-efficient of co-localization with Mitotracker Deep Red FM (Fig. 1b, Supplementary Fig. 1a). We next determined the apoptotic sensitivity of GFP–tBID 2A BCL-xL expressing cells following treatment with the prototypic BH3 mimetic, ABT-737 (ref. 14). Cell viability was determined by live-cell imaging and SYTOX Green exclusion (Fig. 1c). Importantly, ABT-737 treatment rapidly induced cell death in GFP–tBID 2A BCL-xL expressing cells in a synchronous and concentration-dependent manner (Fig. 1c, Supplementary Movies 1 and 2). In line with an on-target effect, treatment with ABT-737 alone, but not its less-active enantiomer, caused cell death (Supplementary Fig. 1b). Moreover, BH3 mimetic-induced death was dependent upon active tBID, since ABT-737 treatment of cells expressing an inactive mutant of tBID (G94E)[15] together with BCL-xL failed to trigger cell death as determined by both long- or short-term survival assays (Fig. 1d, Supplementary Fig. 1c,d). Consistent with engagement of mitochondrial apoptosis, ABT-737 treatment led to mitochondrial cytochrome *c* and SMAC release (as a readout of MOMP) (Fig. 1e, Supplementary Movie 3) and caspase activity (as verified by western blot analysis of PARP cleavage) in a concentration-dependent manner (Fig. 1f). Furthermore, inhibition of caspase function following treatment with the pan-caspase inhibitor quinolyl-valyl-O-methylaspartyl-[2,6-difluorophenoxy]-methyl ketone (Q-VD-OPh) (Supplementary Fig. 1e) or by small-hairpin-RNA-mediated knockdown of APAF-1 effectively suppressed ABT-737-induced cell death, confirming engagement of mitochondrial apoptosis (Fig. 1g and Supplementary Fig. 1f). Finally, we examined the general utility of this method in other cell lines. For this purpose, we generated HeLa, E1A/Ras transformed murine embryonic fibroblasts and 3T3-SA cells stably expressing GFP–tBID 2A BCL-xL (Supplementary Fig. 1g,h). Stably expressing cells were treated with ABT-737 or enantiomer and analysed for cell viability by SYTOX Green exclusion. Following ABT-737 treatment, all three cell types efficiently died in a manner that was dependent on GFP–tBID 2A BCL-XL expression (Fig. 1h). These results demonstrate that mito-priming is an effective way to engineer Bcl-2 addiction *in vitro*. Following BH3 mimetic treatment, it provides an easy and robust way to induce mitochondrial-dependent apoptosis in a rapid and synchronous manner, avoiding off-target effects inherent to commonly used treatments.

Applying mito-priming to characterize BH3 mimetics. We reasoned that mito-priming would be ideally suited to determine the selectivity and potency of different BH3 mimetics on an identical cellular background. For this purpose, we generated SVEC cells co-expressing GFP-tBID in combination with BCL-2, BCL-xL or MCL-1, hereafter referred to as BCL-2-, MCL-1- or BCL-xL-dependent cells. Mito-primed cells were treated with increasing concentrations of the BCL-2/BCL-xL targeting BH3 mimetics, ABT-737 or ABT-263, the BCL-2 targeting BH3 mimetic ABT-199 or the BCL-xL-directed BH3 mimetics, WEHI-539, A-1155463 or A-1331852 (Fig. 2a,b)[14,16–19]. Cell viability was measured by live-cell imaging and SYTOX Green exclusion. Verifying their on-target selectivity, ABT-737 and −263 efficiently killed both BCL-xL- and BCL-2-dependent cells, ABT-199-induced death specifically in BCL-2-dependent cells

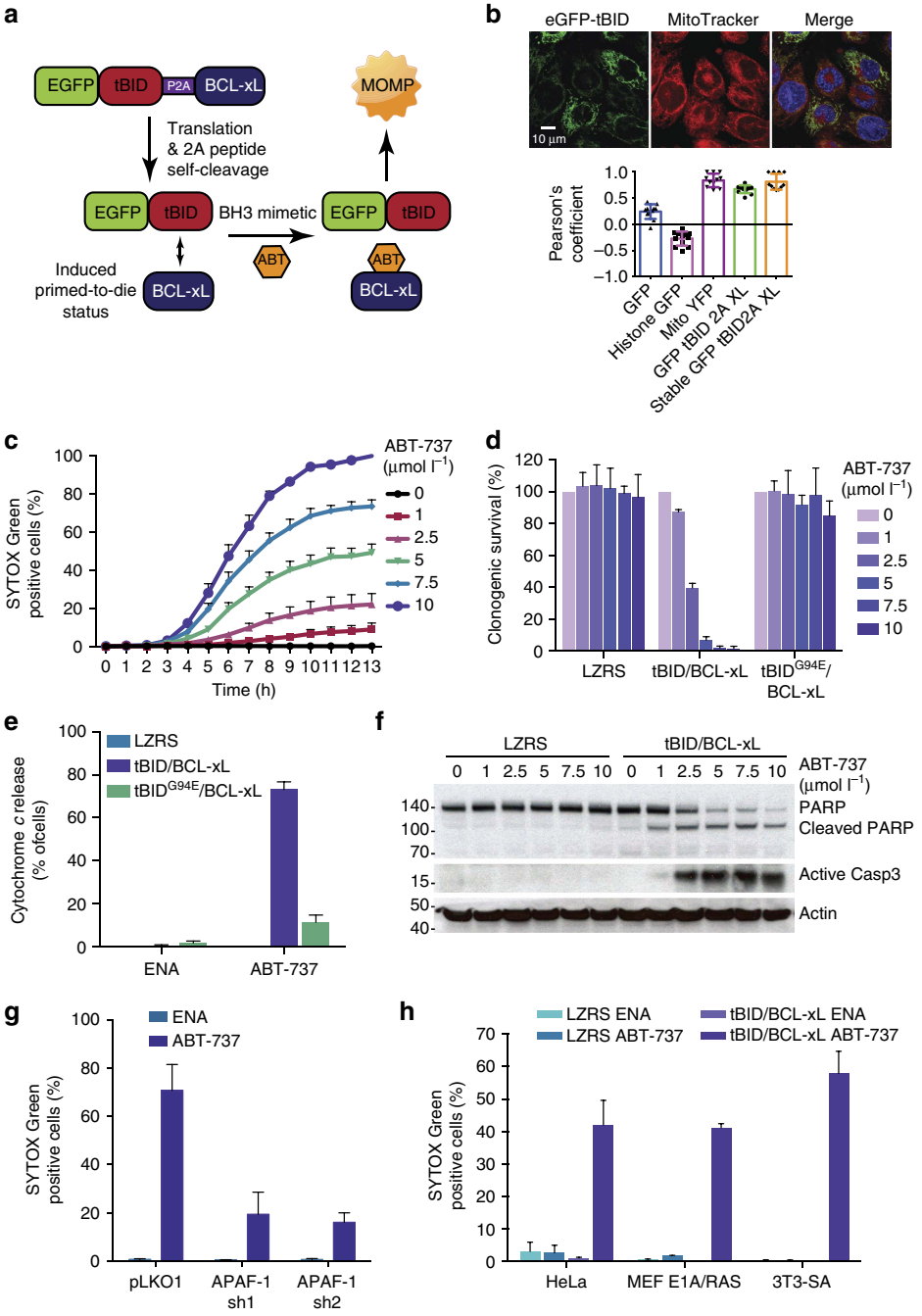


Figure 1 | Mito-priming as a method of induced Bcl-2 addiction. (**a**) Method outline. (**b**) SVEC cells expressing eGFP-tBID 2A BCL-xL or other constructs were co-stained with MitoTracker Deep Red. Colocalization was quantified using the Pearson's coefficient. Representative images show eGFP-tBID expression and MitoTracker Deep Red staining from SVEC cells stably expressing eGFP-tBID 2A BCL-xL. Scale bar, 10 µm. (**c**) SVEC cells expressing eGFP-tBID 2A BCL-xL were treated with ABT-737 and analysed for cell viability using an IncuCyte imager and SYTOX Green exclusion. Percentage cell death was calculated by normalizing against maximal cell death (13-h treatment with 10 µmol l^{-1} ABT-737). Error bars represent the standard error of the mean (s.e.m.) from three independent experiments. (**d**) SVEC cells stably expressing the indicated constructs were treated with increasing concentrations of ABT-737 (µmol l^{-1}; 24 h) and assayed for clonogenic survival. Error bars represent the s.d. of triplicate samples from a representative experiment carried out twice independently. (**e**) SVEC cells stably expressing indicated constructs were treated with increasing concentration of ABT-737 (µmol l^{-1}) for 6 h with 10 µmol l^{-1} ABT-737 in presence of Q-VD-OPh. Cells were quantified for cytochrome *c* release by confocal microscopy. Error bars represent the s.e.m. of three independent experiments. (**f**) SVEC cells stably expressing the indicated constructs were treated for 6 h with ABT-737 (µmol l^{-1}). PARP and caspase-3 cleavage was determined by western blot. Actin was probed as a loading control. (**g**) SVEC cells stably expressing the indicated constructs were treated for 13 h with 10 µmol l^{-1} ABT-737 or enantiomer (ENA). Cell viability was determined as in **c**. Percentage cell death was calculated by normalizing against 100% cell death (24-h treatment with 1 µmol l^{-1} actinomycin D). (**h**) Cell lines stably expressing control vector (pLKO1) or two independent shRNA sequences targeting APAF-1 were treated for 16 h with enantiomer (ENA) or ABT-737. 100% death: 24-h treatment with 1 µmol l^{-1} actinomycin D (for each line). Cell viability was determined as in **c**. Percentage cell death was calculated by normalizing against 100% cell death (24-h treatment with 1 µmol l^{-1} actinomycin D). In **g**,**h** error bars represent the s.e.m. of three independent experiments. See also Supplementary Fig. 1 and Supplementary Movies 1–3. Q-VD-OPh, quinolyl-valyl-*O*-methylaspartyl-(2,6-difluoro- phenoxy)-methyl ketone.

and WEHI-539, A-1155463 and A-1331852 specifically killed BCL-xL-dependent cells (Fig. 2c,d). Moreover, none of these BH3 mimetics induced cell death in the MCL-1-dependent SVEC cells (Supplementary Fig. 2a,b). The highly selective cytotoxic effect of all BH3 mimetics was also apparent by long-term clonogenic survival assay (Fig. 2e,f). Notably, supporting previous findings, the dual-BCL-xL/BCL-2 inhibitors ABT-737 and ABT-263 induced death more effectively in BCL-2-dependent cells compared with BCL-xL-dependent cells (Fig. 2c,d)[11,20]. Our method also allowed direct comparison of BH3 mimetic potency within a specific Bcl-2-dependent cell line. This revealed that WEHI-539, A-1155463 and A-1331852 and ABT-199 were more effective at inducing death in their cognate target SVEC cells compared to the dual-BCL-2/BCL-xL inhibitors, ABT-263 and ABT-737 (Fig. 2c–f). Furthermore, direct comparison between BCL-xL targeting BH3 mimetics demonstrated that A-1155463 and A-1331852 were significantly more potent than WEHI-539 (Fig. 2c–f). This was further supported by analysing cell viability over an extended concentration range, revealing EC_{50} values of approximately 500 and 100 nmol l^{-1} for A-1155463 and A-1331852 respectively, compared with 2.5 µmol l^{-1} of WEHI-539 (Fig. 2g and Supplementary Fig. 2c). At maximally effective doses, A-1155463, A-1331852 and WEHI-539 displayed high selectivity for BCL-xL whereas at higher levels

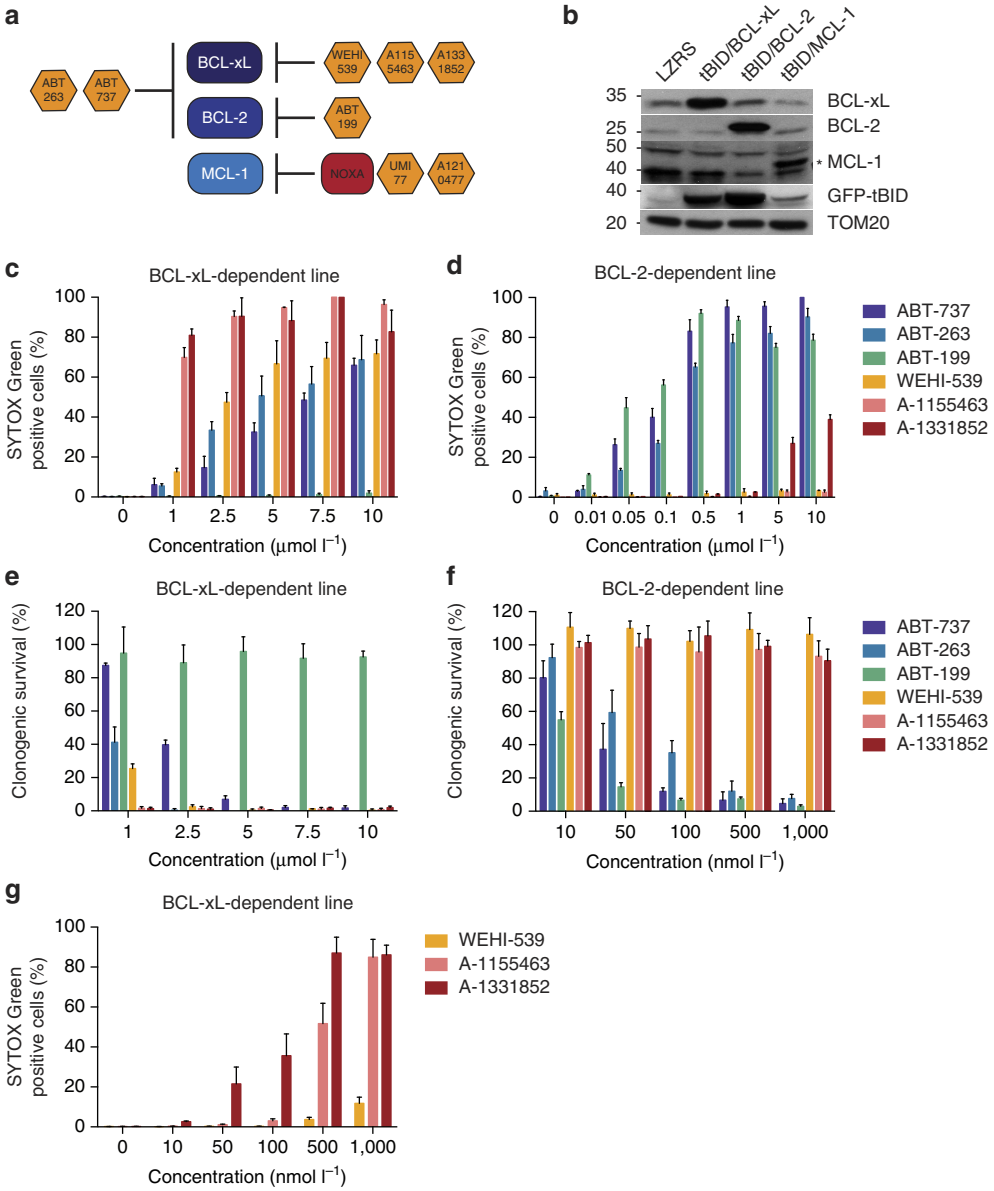


Figure 2 | Applying mito-priming to define the selectivity and potency of BH3 mimetics. (**a**) Predicted pattern of inhibition by different BH3 mimetics tested. (**b**) Western blot analysis of SVEC cells stably expressing eGFP-tBID 2A BCL-xL, eGFP-tBID 2A BCL-2 or eGFP-tBID 2A MCL-1. * denotes ectopically expressed MCL-1. (**c**,**d**) SVEC cells stably expressing eGFP-tBID 2A BCL-xL (BCL-xL-dependent line) or eGFP-tBID 2A BCL-2 (BCL2-dependent line) were treated with increasing concentrations of different BH3 mimetics. Cell viability was determined by SYTOX Green dye exclusion and live-cell imaging using an IncuCyte imager. Error bars represent the s.e.m. of three independent experiments. (**e**,**f**) BCL-xL (**e**) or BCL-2-dependent lines (**f**) were treated with increasing concentrations of different BH3 mimetics and analysed for long-term survival by clonogenic assay. Percentage clonogenic survival is plotted relative to untreated cells. Error bars represent the s.d. of triplicate samples from a representative experiment carried out twice independently. (**g**) BCL-xL-dependent line was treated with increasing concentrations of BCL-xL-directed BH3 mimetics. Cell viability was determined by SYTOX Green dye exclusion and live-cell imaging using an IncuCyte imager. Errors bars represent the s.e.m. of three independent experiments. See also Supplementary Fig. 2.

(5–10 μmol l^{-1}) some off-target toxicity for was also observed for A-1331852 in BCL-2-dependent cells (Fig. 2d). These data demonstrate that mito-priming can be used to render cell viability dependent on any given Bcl-2 prosurvival family member. In doing so, this permits rapid analysis of both the potency and selectivity of BH3 mimetic compounds.

Mito-priming defines potent MCL-1 targeting BH3 mimetics. Intense interest surrounds the development of MCL-1 inhibitors mainly because current, clinically relevant BH3 mimetics do not target MCL-1. We aimed to use our line stably expressing GFP–tBID 2A MCL-1 to investigate the potency and selectivity of MCL-1 targeted BH3 mimetics. We first confirmed the MCL-1 dependency of these cells by transient expression of NOXA, a BH3-only protein that selectively binds to and inhibits MCL-1 prosurvival function[21]. Accordingly, NOXA expression preferentially killed MCL-1-dependent SVEC cells (Fig. 3a). Next, we investigated the potency of two recently described MCL-1 inhibitors, UMI-77 and A-1210477 (refs 22,23). MCL-1-dependent SVEC cells were treated with varying doses of each inhibitor and assayed for cell viability by SYTOX Green exclusion and live-cell imaging. Both inhibitors induced cell death in the MCL-1-dependent line in a dose-dependent manner (Fig. 3b). Notably, A-1210477 was significantly more potent than UMI-77, with an EC_{50} below 5 μmol l^{-1} compared with 10 μmol l^{-1} for UMI-77 (Fig. 3b). In line with increased potency, A-1210477 also induced cell death more rapidly (Fig. 3c). The selectivity of these two compounds for targeting MCL-1 over other Bcl-2 family members was next examined. BCL-2-, BCL-xL- and MCL-1-dependent SVEC cells were treated with either inhibitor and assayed for cell viability by short-term, SYTOX Green exclusion and long-term clonogenic survival assay. Both inhibitors preferentially killed MCL-1-dependent SVEC cells, attesting to their on-target specificity (Fig. 3d,e). Whereas A-1210477 solely killed MCL-1-dependent cells, UMI-77 also displayed limited toxicity in BCL-2-dependent SVEC cells (Fig. 3d,e) demonstrating that UMI-77 also affects BCL-2 prosurvival function. Using our approach of induced MCL-1 addiction, our data demonstrate that both UMI-77 and A-1210477 are effective and specific MCL-1 inhibitors, with A-1210477 displaying greater potency and specificity.

tBID and PUMA can display a dependence on BAK to kill. The active form of BID (tBID), BIM and possibly PUMA, represent a subset of BH3-only proteins, called activators, that directly activate the effector proteins BAX and BAK, causing mitochondrial

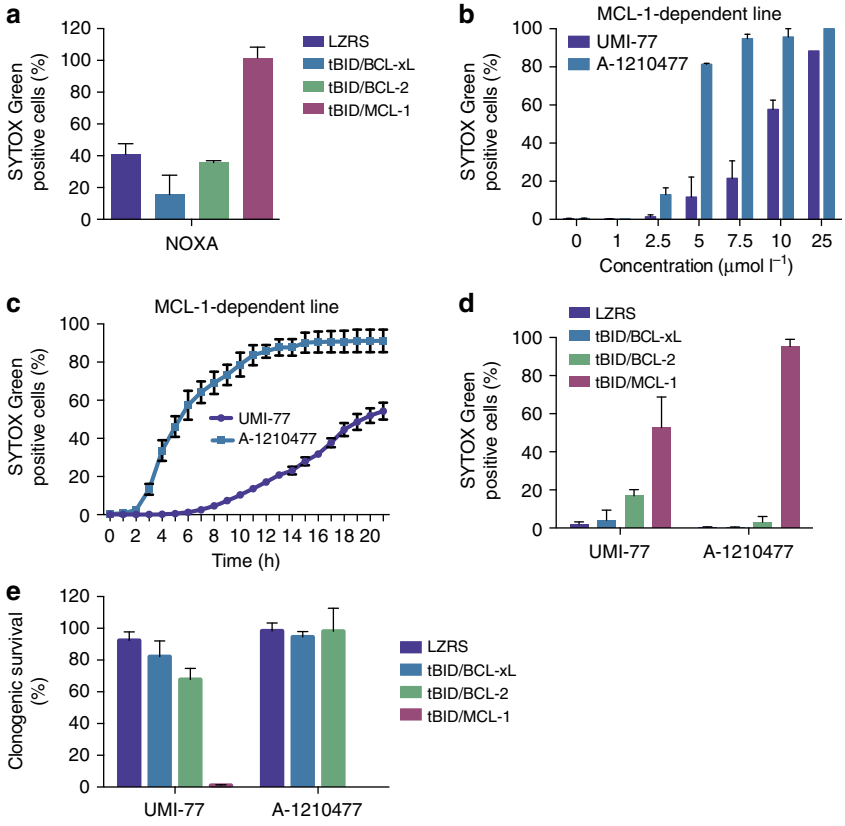


Figure 3 | Mito-priming defines potent and specific MCL-1 targeting BH3 mimetics. (**a**) SVEC cells stably expressing FLAG-tBID 2A GFP-BCL-xL, FLAG-tBID 2A GFP-BCL-2 or FLAG-tBID 2A GFP-MCL-1 were transiently transfected with NOXA. Cell viability was analysed 24 h post-transfection by SYTOX Green dye exclusion and live-cell imaging using an IncuCyte imager. Error bars represent the s.e.m. of three independent experiments. (**b**) SVEC cells stably expressing FLAG-tBID 2A GFP-MCL-1 (MCL-1-dependent line) were treated with increasing concentrations of putative MCL-1 inhibitors UMI-77 or A-1210477. Cell viability was analysed 24 h post-treatment by SYTOX Green dye exclusion and live-cell imaging using an IncuCyte imager. Error bars represent the s.e.m. of three independent experiments. (**c**) MCL-1-dependent line was treated with UMI-77 or A-1210477 (both 10 μmol l^{-1}) and analysed over time for cell viability by SYTOX Green dye exclusion and live-cell imaging using an IncuCyte imager. Error bars represent the s.e.m. of three independent experiments. (**d**,**e**) SVEC cells stably expressing FLAG-tBID 2A GFP-BCL-xL, FLAG-tBID 2A GFP-BCL-2 or FLAG-tBID 2A GFP-MCL-1 were treated with UMI-77 or A-1210477 (10 μM for 24 h) then cell viability was analysed by SYTOX Green dye exclusion and live-cell imaging using an IncuCyte imager (**d**) or by clonogenic survival assay (**e**). Error bars represent the s.e.m. of three independent experiments for **d** and s.d. of triplicate samples from a representative experiment carried out twice independently for **e**. In all cases, cells were treated with MCL-1 inhibitors in 3% FBS containing DMEM.

permeabilization and cell death. Recently, tBID and BIM have been shown to display selectivity for BAK over BAX, although whether this also holds true for PUMA remains untested[24]. To investigate this, we applied our approach of mito-priming in *BAX*-, *BAK*- or *BAX*/*BAK*-deleted cells (Fig. 4a). SVEC cells stably co-expressing tBID, BIM_s or PUMA together with BCL-xL were generated (Supplementary Fig. 3a). In stable lines expression levels of PUMA were highest followed by BIM_s and tBID. Next, CRISPR-/Cas9-based genome editing was used to delete *BAX* and/or *BAK* (Fig. 4b). Cells were treated with ABT-737 and assayed for cell viability by live-cell imaging and SYTOX Green exclusion or by long-term clonogenic survival assay. As expected, combined deletion of *BAX* and *BAK* prevented cell death in all cases (Fig. 4c,d). Importantly, whereas BIM-induced death displayed no selectivity, specific deletion of *BAK* effectively protected against tBID- and PUMA-induced cell death in both short- and long-term viability assays (Fig. 4c,d). Confirming BAK-dependent selectivity and on-target genome editing, reconstitution of *BAK* CRISPR-edited SVEC cells with BAK restored sensitivity to tBID and PUMA killing, (Fig. 4e and Supplementary Fig. 3b). These data demonstrate that PUMA and tBID selectively require BAK to induce apoptosis in this cell-type. Further supporting this, caspase activity (determined by western blotting for PARP and caspase-3 cleavage), was substantially reduced specifically in BAK-deficient cells following ABT-737 treatment (Fig. 4f). After ABT-737 addition, BCL-xL complexed to either PUMA or BIM_s was significantly reduced, as determined by immunopreciptation (Supplementary Fig. 3c). Supporting a transient 'hit-and-run' interaction, no direct interaction between BIM_s or PUMA with BAX or BAK could be detected by immunoprecipitation. To confirm that tBID selectivity for BAK was not due to co-expression of BCL-xL we carried out similar experiments in BCL-2-dependent cells. Using CRISPR/Cas9 genome editing, *BAK*, *BAX* or *BAK* and *BAX* were deleted in GFP–tBID-2A-BCL-2-expressing SVEC cells (Supplementary Fig. 3d). Cells were treated with varying concentrations of ABT-199 and assessed for cell death by SYTOX Green exclusion and live-cell imaging. Importantly, in line with previous results, deletion of *BAK* or *BAX* and *BAK* effectively prevented tBID-induced death, whereas deletion of *BAX* had little effect (Fig. 4g). Finally, we generated HeLa cells expressing GFP-tBID 2A BCL-xL, GFP-PUMA 2A BCL-xL or GFP-BIM_s 2A BCL-xL that were deficient in *BAX*, *BAK* or *BAX* and *BAK* and tested their sensitivity to ABT-737 treatment (Fig. 4h, Supplementary Fig. 3e). In contrast to our previous results, deletion of either *BAX* or *BAK* conferred a similar level of protection against tBID and PUMA induced death in HeLa cells, arguing against a selective preference for either BAX or BAK in this setting (Fig. 4h). BAX levels were similar between different cell types ruling this out as a determinant of selectivity (Supplementary Fig. 3f). Interestingly, unlike SVEC cells, HeLa cells expressing GFP-BIM_s 2A BCL-xL, poorly responded to ABT-737 treatment (Fig. 4h). Of note, a failure to disrupt BIM/BCL-xL complexes by ABT-737 treatment has also been observed by others[25]. Along these lines, possibly accounting for this resistance, co-immunoprecipitation analysis revealed that ABT-737 treatment failed to disrupt the interaction between BIM_s and BCL-xL, (Supplementary Fig. 3g). By combining mito-priming with CRISPR/Cas9-mediated genome editing, our results demonstrate that BH3-only proteins can exhibit a preference for BAK over BAX in some cellular contexts. While previously observed for tBID, we also find a similar preference for BAK by PUMA.

Mapping determinants of BAK-dependent apoptosis. The selective requirement of tBID and PUMA for BAK may be due to a preferential ability to activate BAK or an inability to oppose neutralization of BAX by anti-apoptotic Bcl-2 family members. To discriminate these possibilities, we investigated whether PUMA and tBID also displayed selectivity for BAK in the absence of anti-apoptotic Bcl-2 co-expression. To this end, GFP–tBID and GFP–PUMA were transiently expressed in *BAX* and/or *BAK*-deleted SVEC cells. In line with our earlier findings, tBID and PUMA still preferentially killed in a BAK-dependent manner (Fig. 5a). In a separate approach, we examined whether combined neutralization of MCL-1, BCL-xL and BCL-2 had any effect on the BAK dependency of tBID-induced killing. For this purpose, we used *BAX* and/or *BAK* CRISPR-edited SVEC cells that were stably expressing GFP tBID 2A BCL-xL. Cells were treated with a combination of A-1331852, A-1210477 and ABT-199 to neutralize anti-apoptotic Bcl-2 function and analysed for cell viability by SYTOX Green exclusion and live-cell imaging (Fig. 5b). Importantly, irrespective of pan-Bcl-2 inhibition, tBID-induced cell death still displayed BAK dependence. Similar results were obtained for PUMA-induced cell death (Fig. 5c). Collectively, these data argue that the dependency of tBID and PUMA for BAK is direct and not through differential neutralization of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. We next determined whether BH3-only protein selectivity for BAK was an intrinsic property of one or both proteins. To this end, mitochondria were isolated from SVEC cells stably expressing GFP-tBID 2A BCL-xL that were *BAK* or *BAK*/*BAX* deleted. Mitochondria from *BAX*/*BAK*-deleted cells were treated with recombinant BAX in the presence or absence of recombinant tBID or ABT-737. Alternatively, mitochondria from *BAK*-deleted cells were treated with tBID or ABT-737. Mitochondrial permeabilization was assessed by western blotting for cytochrome *c* (Fig. 5d). Importantly, recombinant BAX in combination with tBID or ABT-737 effectively permeabilized mitochondria from *BAX*/*BAK*-deleted cells. Moreover, tBID or ABT-737 treatment effectively permeabilized mitochondria from *BAK*-deleted cells, where residual BAX permitted permeabilization (Fig. 5d, Supplementary Fig. 4). Given that *BAK* deletion effectively prevented tBID-induced killing (Fig. 4c, Supplementary Fig. 3b) these data demonstrate that an intact cellular environment is required for the selective dependence of tBID on BAK. Finally, they argue that the differential requirement for BAX or BAK by specific BH3-only proteins lies at the point of activation of these effectors, as opposed to effects on anti-apoptotic Bcl-2 function.

BH3-only dependency on BAK is dictated by the BH3-domain. We next focused on the BH3-domain as a possible determinant of BAX/BAK specificity. Our earlier results demonstrated that BIM_s displayed no selective requirement for BAX or BAK. Therefore, we initially decided to swap the BH3 domains between tBID and BIM_s and ask whether this affected BAX/BAK selectivity. SVEC cells stably expressing $tBID^{BIM\ BH3}$ or $BIM^{tBID\ BH3}$ together with BCL-xL were generated (Fig. 6a) then *BAX* and/or *BAK* were deleted by CRISPR/Cas9-based genome editing (Supplementary Fig. 5a). Cells were treated with ABT-737 and monitored for cell viability by short-term SYTOX Green exclusion/live-cell imaging or by long-term clonogenic survival assay (Fig. 6b,c). Strikingly, BIM_s encoding the BID BH3 domain displayed an absolute dependence on BAK to kill cells. This contrasts with our earlier results demonstrating that wild-type BIM_s displayed no selective preference for BAX or BAK (Fig. 4c). Conversely, tBID encoding the BIM BH3 domain lost any specificity, killing *BAK*- or *BAX*-deleted cells equally well. Using a similar approach, we next investigated whether the PUMA BH3 domain also dictated a selective dependence for BAK. SVEC cells stably expressing $PUMA^{BIM\ BH3}$ or $BIM_s^{PUMA\ BH3}$ together with BCL-xL were generated (Fig. 6d) then *BAX* and/or *BAK* were deleted by CRISPR/Cas9-based genome editing (Supplementary Fig. 5b).

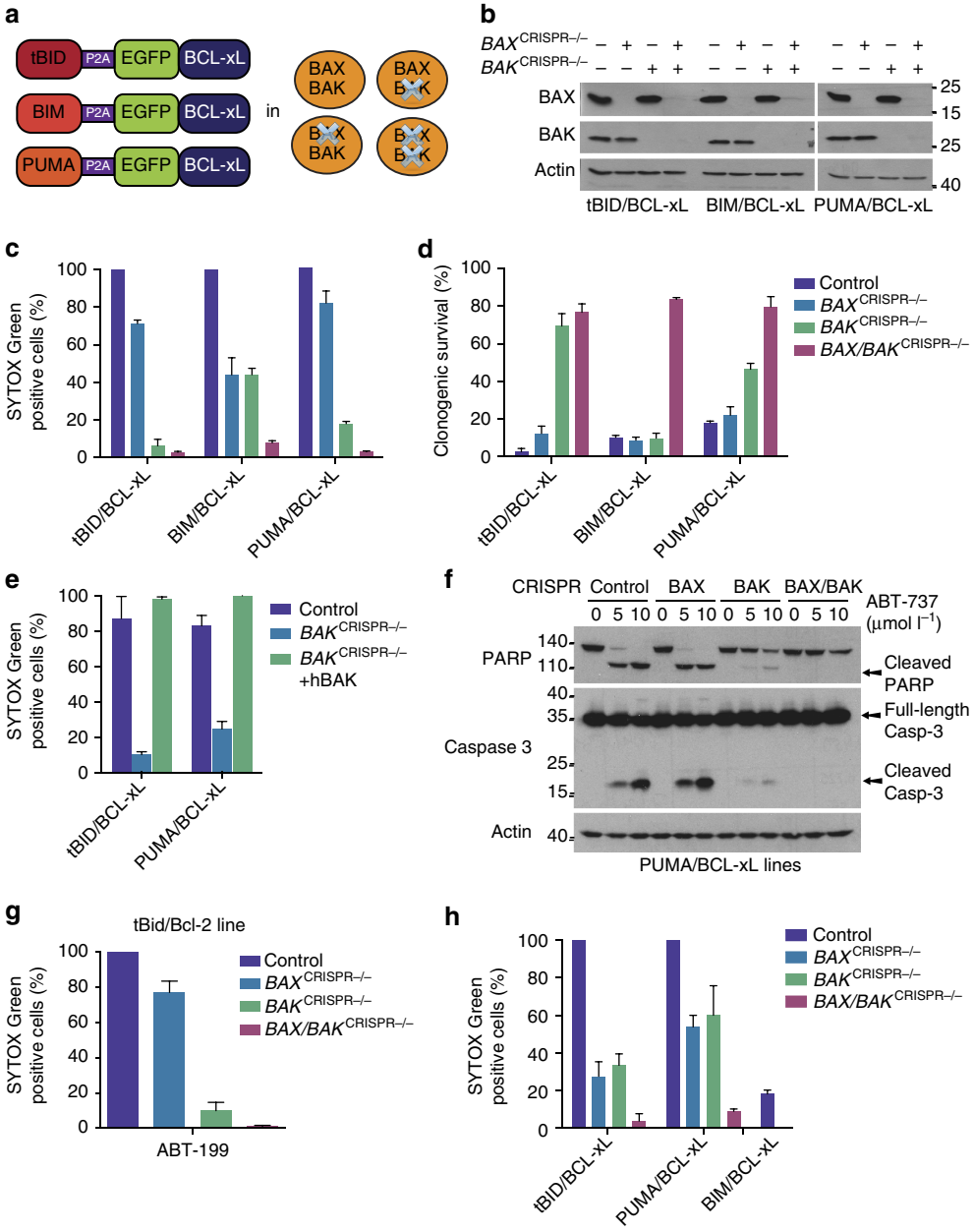


Figure 4 | Mito-priming reveals a dependence of tBID and PUMA for BAK over BAX. (**a**) Overview of cell lines generated. (**b**) Western blot analysis of BAX and BAK expression in CRISPR/CAS9 genome edited cell lines. Actin was probed as a loading control. (**c**,**d**) SVEC cells stably expressing tBID-, BIM- or PUMA 2A GFP-BCL-xL were treated with ABT-737 (10 μmol l^{-1}) then cell viability was analysed by SYTOX Green dye exclusion and live-cell imaging using an IncuCyte imager (**c**) or by clonogenic survival assay (**d**). In **c** cell death was normalized to treated, empty CRISPR control for each line (Control, each 100% cell death). Error bars represent the s.e.m. of 3 independent experiments (**c**) or s.d. of triplicate samples from a representative experiment carried out twice independently (**d**). (**e**) BAK-deleted or reconstituted SVEC cells stably expressing FLAG-tBID 2A BCL-xL or FLAG-PUMA 2A BCL-xL were treated with ABT-737 (10 μmol l^{-1} for 16 h). Cell viability was analysed by SYTOX Green dye exclusion and IncuCyte imaging. Percentage cell death was calculated following normalization to treated control for each line (each 100% cell death). Errors bars represent the s.e.m. of three independent experiments. (**f**) SVEC cells stably expressing FLAG-PUMA 2A BCL-xL were treated for 4 h with increasing concentrations of ABT-737. Cleavage of caspase-3 and PARP was assessed by western blot. Actin was probed as a loading control. (**g**) Genome-edited SVEC cells stably expressing eGFP-tBID 2A BCL-2 were treated with ABT-199 (10 μmol l^{-1}) and analysed for cell viability using SYTOX Green exclusion and IncuCyte imaging. Percentage cell death was calculated following normalization to ABT-199 treated empty CRISPR vector control line for 16 h. Errors bars represent the s.e.m. of three independent experiments. (**h**) Genome-edited HeLa cells stably expressing either eGFP-tBID, BIM or PUMA 2A BCL-xL were treated with 10 μmol l^{-1} ABT-737 for 24 h and analysed for cell viability by SYTOX Green exclusion and IncuCyte imaging. 100% death was set-up as the maximal ABT-737-induced death in the empty control line. Errors bars represent the s.e.m. of three independent experiments. See also Supplementary Fig. 3.

Mirroring our findings with tBID, engraftment of the BIM BH3-domain into PUMA abolished its selective preference for BAK (Fig. 6e). In the reciprocal swap, cells expressing BIM encoding the PUMA BH3-domain failed to respond to ABT-737 treatment, possibly due to reduced expression of the $BIM^{PUMABH3}$ chimera (Fig. 6d,e). Collectively, these data demonstrate that the BH3-domain is a key determinant in defining selectivity for BAX or BAK.

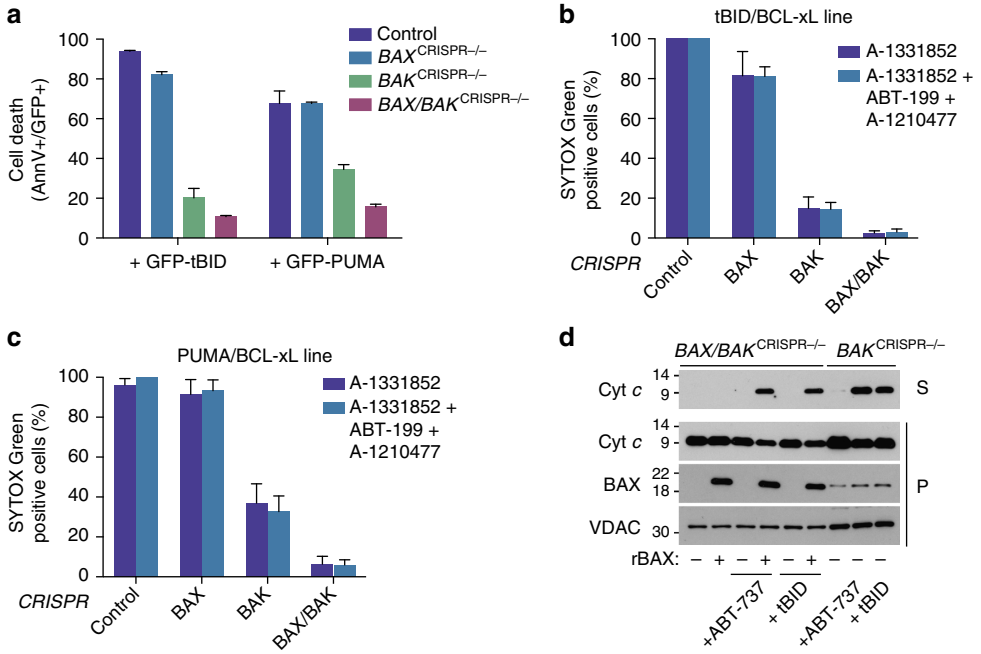


Figure 5 | Selective dependence of tBID and PUMA for BAK is independent of prosurvival Bcl-2 function and requires a cellular environment. (**a**) SVEC cell lines were transiently transfected with GFP-tBID or GFP-PUMA. Sixteen hours post transfection the percentage of Annexin V-positive cells in the GFP-expressing population (AnnV +/GFP +) was quantified by flow-cytometry. Error bars represent the s.d. of triplicate samples from a representative experiment carried out twice independently. (**b**) Control, BAX and/or *BAK* $^{CRISPR-/-}$ cells stably expressing eGFP-tBID 2A BCL-xL were treated with for 1 h with 10 μmol l^{-1} ABT-199 and A-1210477 before the addition of A-1331852 (10 μmol l^{-1}). Cell viability was analysed by SYTOX Green dye exclusion and live-cell imaging using an IncuCyte imager. Percentage cell death was calculated following normalization to treated control for each line (each 100% cell death). Error bars represent the s.e.m. from three independent experiments. (**c**) Control, *BAX* and/or *BAK* $^{CRISPR-/-}$ SVEC cells stably expressing eGFP-PUMA 2A BCL-xL were treated as in **b**. Errors bars represent the s.e.m. from three independent experiments. (**d**) Isolated mitochondria from *BAX* and/or *BAK* $^{CRISPR-/-}$ SVEC cells stably expressing eGFP-tBid 2A BCL-x_L were treated in the presence or absence of 100 nM recombinant wild-type Bax and/or 10 μM ABT-737 or 10 nM recombinant tBID. Mitochondrial permeabilization was monitored by western blot analysis of cytochrome *c* into the supernatant (S). The mitochondrial fraction (P), Bax and VDAC serve as loading controls.

Discussion

In this study, we outline an effective means to render cells addicted to anti-apoptotic Bcl-2 prosurvival function—a method we call mito-priming. Following co-expression of pro- and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins, cells are highly sensitive to Bcl-2 inhibition allowing BH3 mimetic treatment to trigger apoptosis in a rapid manner. We demonstrate the utility of this method to compare the specificity and potency of different BH3 mimetics. Moreover, using our approach, we find that tBID and PUMA, can display selectivity for BAK over BAX in the activation of mitochondrial apoptosis. Our data demonstrate that tBID and PUMA selectivity for BAK, whilst dictated by the BH3-domain, is independent of anti-apoptotic Bcl-2 inhibition.

The rationale behind mito-priming is based on earlier findings that some cancer cells are 'primed for death' and require anti-apoptotic Bcl-2 function for survival[5]. Interestingly, ectopic expression of Bcl-2 family members alone can facilitate apoptotic priming in some settings thereby sensitizing cells to pro-death triggers[26,27]. Nevertheless, anti-apoptotic Bcl-2 expression often renders cells resistant to apoptotic stimuli. By simultaneously co-expressing pro- and anti-apoptotic Bcl-2 proteins, our method of mito-priming is broadly applicable to different cell types. Furthermore, it allows rapid interrogation of specific BH3-only/Bcl-2 combinations in the regulation of apoptosis. One potential caveat of this method is that mito-priming is subject to modulation by endogenous BH3-only proteins. Given the high-level of exogenous BH3-only expression and the lack of response of the unmodified cell lines used here to BH3 mimetics (thereby indicating low BH3-only load) these effects may be negligible (Fig. 1d–f)[28]. Nevertheless, to circumvent any influence of endogenous BH3-only proteins, mito-priming could be applied in BH3-only protein deficient cells. Finally, the ability to easily generate stably 'mito-primed' cell lines allows the induction of apoptosis over the whole population in a synchronous manner that is not easily achievable via other means.

Because of their central role in maintaining cell viability, intense interest surrounds the targeting of anti-apoptotic Bcl-2 proteins in cancer. To date, the most effective inhibitors of Bcl-2 function are BH3 mimetics. As a monotherapy, BH3 mimetics effectively kill cancer cells that are so-called 'primed-to-die'. Due to their high BH3-only protein load, primed-to-die cells require anti-apoptotic Bcl-2 function for survival. By creating a Bcl-2 dependency *in vitro*, our method effectively phenocopies primed-to-die cells such that addition of BH3 mimetic alone leads to rapid cell death. In addition to using BH3 mimetics to engage cell death, our method also provides a rapid and robust means to screen BH3 mimetic potency and selectivity. Using this approach we determined that ABT-199 and A-1331852 are the most potent, currently available inhibitors of BCL-2 and BCL-xL, respectively. Moreover, we identify UMI-77 and A-1210477 as effective inhibitors of MCL-1 function *in vitro*, with A-1210477 displaying the greatest potency and selectivity.

It has recently been shown that tBID and BIM can display selectivity for BAK over BAX in the engagement of MOMP and apoptosis[24]. By combining our approach of induced Bcl-2 addiction with CRISPR/Cas9-based deletion of *BAX* or *BAK*, we find that PUMA, in addition to tBID, can also display selectivity

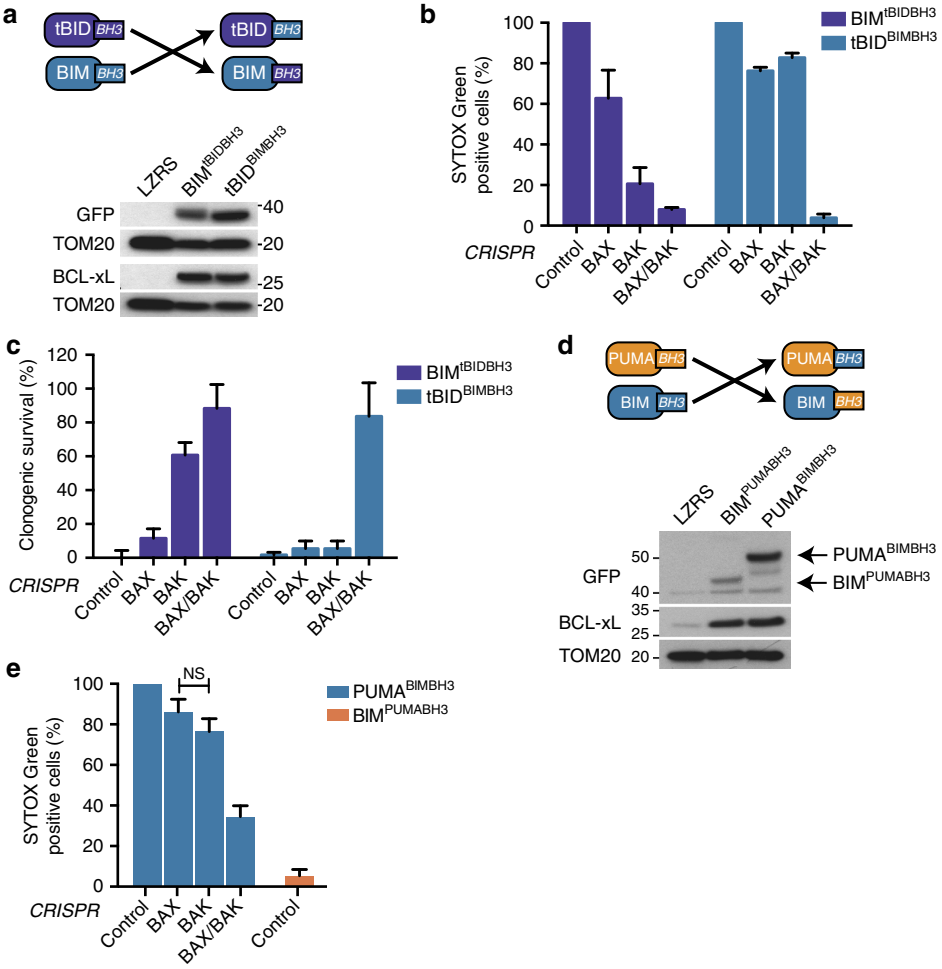


Figure 6 | BH3-only protein dependency for BAK is dictated by the BH3-domain. (**a**) SVEC cells stably expressing GFP-BIM$^{tBID\ BH3}$ or GFP-tBID$^{BIM\ BH3}$ together with BCL-xL were analysed by Western blot for construct expression. (**b**,**c**) Cell death and long-term clonogenic survival of GFP-BIM$^{tBID\ BH3}$ and GFP-tBID$^{BIM\ BH3}$ 2A BCL-xL CRISPR lines treated with 10 μmol l^{-1} ABT-737. (**b**) Error bars represent the s.e.m. of three independent experiments. Percentage cell death was calculated by normalizing to ABT-737-induced death in the empty CRISPR control line (100% death). (**c**) Error bars represent the s.d. of triplicate samples from a representative experiment carried out twice independently. (**d**) SVEC cells stably expressing GFP-BIM$^{PUMA\ BH3}$ or GFP-PUMA$^{BIM\ BH3}$ together with BCL-xL were analysed by western blot for construct expression. (**e**) Cell death of GFP-BIM$^{PUMA\ BH3}$ and GFP-PUMA$^{BIM\ BH3}$ 2A BCL-xL CRISPR lines treated with 10 μmol l^{-1} ABT-737. Error bars represent the s.e.m. of three independent experiments. Percentage cell death was calculated by normalizing to ABT-737-induced death in the empty CRISPR control line (100% death). See also Supplementary Fig. 4.

for BAK. Selective dependence for BAK can be uncoupled from BH3-only expression level, since BIM$_S$ displayed no selective dependence yet was expressed at levels intermediate to tBID and PUMA. The selective dependence of PUMA and tBID for BAK appears to be independent of differential neutralization of anti-apoptotic Bcl-2 function for two main reasons: (1) selective preference of tBID and PUMA for BAK was maintained following combined neutralization of BCL-2, BCL-xL and MCL-1 (Fig. 5b,c) and (2) BIM, which displays an anti-apoptotic Bcl-2 binding profile similar to tBID and PUMA[5,21,29], failed to display any selectivity for BAK or BAX. Nevertheless, our data demonstrate that the BH3-domain is the key determinant for BAK selectivity by tBID and PUMA—engraftment of the tBID BH3-domain into BIM$_S$, imparted BAK selectivity on BIM$_S$, whereas engraftment of the BIM BH3-domain into tBID and PUMA abolished selectivity (Fig. 6b–e). These findings support previous data demonstrating that BH3-domain peptides alone can display preference for either BAX or BAK[24]. In contrast to these findings, a recent study using liposome and mitochondrial-based permeabilization assays failed to observe BH3-only preferences for BAX or BAK[30]. Why tBID and PUMA display selectivity for BAK is currently unclear although it appears strictly cell-type dependent. In this case of tBID we found that any selective requirement for BAK was completely lost when mitochondrial permeabilization was assayed using isolated mitochondria. This finding, supported by others[30], argues that the factor(s) mediating selectivity may not solely be integral to differences in Bcl-2 protein interactions.

In summary, by inducing Bcl-2 addiction, mito-priming represents a facile and effective way to induce mitochondrial apoptosis. Importantly, this approach avoids non-MOMP-dependent effects inherent to commonly used apoptotic stimuli. As such, this method should prove an ideal approach to study Bcl-2 regulation of mitochondrial permeabilization, MOMP and its downstream effects. Moreover, mito-priming is well suited for various screening purposes, including the identification and characterization of Bcl-2 targeting compounds as well as novel regulators of mitochondrial-dependent apoptosis.

Methods

BH3 mimetics and cell lines. WEHI-539, ABT-199, −263 and −737 were obtained from Chemietek. UMI-77 was obtained from Selleckchem. ABT-737

enantiomer, A-1210477, A-1155463 and A-1331852 were provided by Abbvie Pharmaceuticals. Cell lines were obtained from the ATCC.

Molecular cloning and cell line generation. 2A constructs were directly cloned into LZRS retroviral backbone between EcoRI and XhoI using Gibson Assembly cloning kit (NEB #E5510S). Fragments for the various BH3-only and prosurvival BCL2 members were amplified by PCR using Phusion High Fidelity polymerase (Life Technologies #F530L) using appropriate human cDNAs as template. The P2A sequence used in this work was: 5′ GGATCCGGAGCCACGAACTTCTCTCTGT TAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCT-3′. Retroviruses were produced using Ampho or Eco Phoenix 293T cells following transfection with Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Target cells were infected twice with viral supernatant in the presence of polybrene (1 μg ml^{-1}) and then selected for 7 days with Zeocin 200 μg ml^{-1} (Life Technologies #R25001). GFP-positive cells were then sorted on a BD FACSAria cell sorter. For CRISPR/Cas9-mediated deletion of *BAX* and *BAK*, sgRNA sequences were selected using the MIT CRISPR design tool (http://crispr.mit.edu/) and cloned into LentiCRISPRv2 backbone (Addgene #52961). The following guide sequences were used: murine BAX: 5′-CAACTTCA ACTGGGGCCGCG-3′(+) and BAK: 5′-GCGCTACGACACAGAGTTCC-3′(−); human BAX: 5′-AGTAGAAAAGGGCGACAACC-3′(−) and BAK: 5′-GCCATG CTGGTAGACGTGTA-3′(−). Lentiviral production, cell infection and selection were performed according to Zhang lab protocol[31]. shRNA sequences targeting murine APAF-1 were GCGGATAAGAAGGTTAAGATT (sh1) and CATGCTTATTTGCACTCTTTA (sh2).

Viability assays. For short-term viability assays, we used SYTOX Green dye exclusion and live-cell imaging using an IncuCyte FLR imaging system (Essen BioScience). Briefly, 5×10^5 cells were plated into 12-well plates. The following day cells were treated as described in the presence of 30 nM SYTOX Green (Life Technologies). Plates were scanned every hour for 24 h, scanning 4 fields per well. Percentage cell death was calculated by normalizing against maximal cell death following BH3-mimetic treatment. Maximal cell death was calculated bv visual inspection of Incucyte images, where percentage cell death = Sytox Green positive cells/total cells (Sytox Green positive plus negative) × 100. Alternatively, in some experiments, 24-h treatment with 1 μM actinomycin D was used as 100% death control. For cell death analysis by flow-cytometry, cells were stained using Alexa Fluor 647 Annexin V (BioLegend #640912) according to the manufacturer's protocol and quantified on a BD FACSCalibur instrument. For clonogenic survival assay, 800 cells stably expressing the construct of interest were plated into each well of a 6-well tissue culture plate. The following days cells were treated with the indicated stimuli. Ten days later, cells were stained with 1% Methylene Blue in methanol/H_2O (1:1 vol/vol). Following image capture, colonies were counted automatically using Fiji software (http://fiji.sc/Fiji) and compared with untreated cells (taken as 100% survival). Images were processed as followed: 1/ conversion of scans into 8 bits images and threshold adjustment to remove background; 2/ separation of colonies using the Watershed tool; 3/ counting of colonies using the Analyze Particles tool.

Microscopy. Confocal imaging was carried out using a Nikon A1R confocal microscope (Nikon Instruments) with laser wavelengths of 405, 488, 561, and 636 nm. Images were acquired with a ×60 NA 1.4 objective. Immunofluorescence staining for cytochrome *c* was performed as follows: SVEC cells stably expressing GFP–tBID 2A BCL-xL and treated with ABT-737 as described in the figure legends were fixed in 4% PFA/PBS for 10 min and permeabilized in 0.2% Triton/PBS for 15 min followed by 1 h blocking in 2% BSA/PBS. The primary antibody and cytochrome *c* (BD Biosciences, 556432, 1/300 in PBS) was incubated overnight. AlexaFluor 647 was used as secondary antibody (Life Technologies, A21245, 1/300 in PBS). Cytochrome *c* was considered released from the mitochondria when it was observed as diffused in the cytosol. For the colocalization studies, SVEC cells stably or transiently expressing GFP–tBID 2A BCL-xL, GFP alone, histone GFP or mito YFP were co-stained with MitoTracker Deep Red FM (ThermoFisher, M22426) according to manufacturer's instruction and then the Pearson's coefficient was determined using ImageJ and JACoP plugin[32]. Cytochrome *c* was considered released from the mitochondria when staining displayed a diffuse localization (as opposed to punctate, mitochondrial localization). Cytochrome *c* release was visually quantified by counting an average of 150 cells (6 different fields) per condition. Error bars represent the s.e.m. of 3 independent experiments.

Mitochondrial permeabilization assay. Mitochondrial fractions were obtained from cells harvested and centrifuged at 1,200*g* for 5 min at 4 °C. The cell pellet was resuspended in s.e.m. Buffer (10 mmol l^{-1} HEPES, 250 mmol l^{-1} sucrose, pH 7.2) supplemented with protease inhibitors and homogenized. Samples were centrifuged at 500*g* for 3 min at 4 °C. The supernatant was transferred to a new tube and subjected to a centrifugation step at 13,000*g* for 30 min at 4 °C. Sedimented mitochondria were washed two times and incubated in the presence or the absence of 100 nmol l^{-1} recombinant Bax and/or 10 nmol l^{-1} tBid (BD Biosciences) and/or 10 μmol l^{-1} ABT-737 for 1 h at 37 °C. Subsequently, mitochondria and supernatant were separated by centrifugation at 13,000*g* for 5 min. Both fractions were subjected to western blot analysis.

Immunoprecipitation. Protein lysates were prepared in ice-cold Triton-X 100 lysis buffer (20 mM Tris-Cl (pH 7.4), 135 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 10% glycerol, 1% Triton-X 100) supplemented with protease inhibitor and PMSF. Lysates (0.5–1 mg) were incubated with 20 μl anti-FLAG M2 affinity gel (A2220, Sigma) for 16 h at 4 °C under end-over-end agitation. Anti-FLAG affinity was then washed five times by centrifugation in ice-cold Triton-X 100 lysis buffer, followed by one wash in TBS (10 mmol l^{-1} Tris-Cl (pH 7.4), 150 mmol l^{-1} NaCl). Bound protein complexes were then eluted in 100 μg ml^{-1} FLAG-peptide (A6002, ApexBio) in TBS for 20 min at room temperature, resuspended in Laemelli sample buffer containing 10 mmol l^{-1} DTT and boiled for 5 min at 95 °C before immunoblot analysis.

Antibodies. For western blotting the following antibodies were used all at 1:1,000 dilution unless otherwise stated; Cell Signaling: PARP (#9532), APAF-1 (#8723), BAK (D4E4, #12105), and Hsp60 (#4870); from Abcam: active caspase 3 (#ab13847), BCL-xL (#ab32370, used at 1/500 dilution), BCL-2 (#ab18210, used at 1/500 dilution), and Mcl-1 (#ab32087, used at 1/500 dilution); from Santa Cruz: TOM20 (#sc-11415) and BAX (N20, #sc-493); from others: actin (MP Biomedicals #8691001, used at 1/10,000 dilution), Flag M2 (Sigma #F1804) and GFP (in house). For immunofluorescence: cytochrome *c* (BD #556432) was used (1/300 dilution). MitoTracker Deep Red 647 (Life Technologies #M22426) was used at a 100 nM final concentration. Images were acquired on a Nikon A1R confocal instrument.

References

1. Tait, S. W. & Green, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11,** 621–632 (2010).
2. Tait, S. W., Ichim, G. & Green, D. R. Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. *J. Cell. Sci.* **127,** 2135–2144 (2014).
3. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15,** 49–63 (2014).
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100,** 57–70 (2000).
5. Certo, M. *et al.* Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer cell* **9,** 351–365 (2006).
6. Ni Chonghaile, T. *et al.* Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science* **334,** 1129–1133 (2011).
7. Lopez, J. & Tait, S. W. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br. J. Cancer* **112,** 957–962 (2015).
8. Lartigue, L. *et al.* Caspase-independent mitochondrial cell death results from loss of respiration, not cytotoxic protein release. *Mol. Biol. Cell* **20,** 4871–4884 (2009).
9. Yamaguchi, R. *et al.* Opa1-mediated cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization. *Mol. Cell* **31,** 557–569 (2008).
10. Jabbour, A. M. *et al.* Puma indirectly activates Bax to cause apoptosis in the absence of Bid or Bim. *Cell Death Differ.* **16,** 555–563 (2009).
11. Rooswinkel, R. W., van de Kooij, B., Verheij, M. & Borst, J. Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-xL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B. *Cell Death Dis.* **3,** e366 (2012).
12. Moullan, N. *et al.* Tetracyclines disturb mitochondrial function across eukaryotic models: a call for caution in biomedical research. *Cell Rep.* **10,** 1681–1691 (2015).
13. Szymczak, A. L. *et al.* Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat. Biotechnol.* **22,** 589–594 (2004).
14. Oltersdorf, T. *et al.* An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **435,** 677–681 (2005).
15. Wang, K., Yin, X. M., Chao, D. T., Milliman, C. L. & Korsmeyer, S. J. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev.* **10,** 2859–2869 (1996).
16. Lessene, G. *et al.* Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* **9,** 390–397 (2013).
17. Tse, C. *et al.* ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* **68,** 3421–3428 (2008).
18. Souers, A. J. *et al.* ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* **19,** 202–208 (2013).
19. Leverson, J. D. *et al.* Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. *Sci. Transl. Med.* **7,** 279ra240 (2015).
20. Merino, D. *et al.* Bcl-2, Bcl-x(L), and Bcl-w are not equivalent targets of ABT-737 and navitoclax (ABT-263) in lymphoid and leukemic cells. *Blood* **119,** 5807–5816 (2012).
21. Chen, L. *et al.* Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* **17,** 393–403 (2005).

22. Abulwerdi, F. *et al.* A novel small-molecule inhibitor of mcl-1 blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **13,** 565–575 (2014).
23. Leverson, J. D. *et al.* Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax). *Cell Death Dis.* **6,** e1590 (2015).
24. Sarosiek, K. A. *et al.* BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response. *Mol. Cell* **51,** 751–765 (2013).
25. Aranovich, A. *et al.* Differences in the mechanisms of proapoptotic BH3 proteins binding to Bcl-XL and Bcl-2 quantified in live MCF-7 cells. *Mol. Cell* **45,** 754–763 (2012).
26. Brunelle, J. K., Ryan, J., Yecies, D., Opferman, J. T. & Letai, A. MCL-1-dependent leukemia cells are more sensitive to chemotherapy than BCL-2-dependent counterparts. *J. Cell. Biol.* **187,** 429–442 (2009).
27. Koss, B. *et al.* Requirement for antiapoptotic MCL-1 in the survival of BCR-ABL B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **122,** 1587–1598 (2013).
28. Ichim, G. *et al.* Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. *Mol. Cell* **57,** 860–872 (2015).
29. Kuwana, T. *et al.* BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol. Cell.* **17,** 525–535 (2005).
30. Hockings, C. *et al.* Bid chimeras indicate that most BH3-only proteins can directly activate Bak and Bax, and show no preference for Bak versus Bax. *Cell Death Dis.* **6,** e1735 (2015).
31. Sanjana, N. E., Shalem, O. & Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* **11,** 783–784 (2014).
32. Bolte, S. & Cordelieres, F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **224,** 213–232 (2006).

Acknowledgements

This work was supported by funding from the Royal Society, a Cancer Research UK Programme Foundation award (C40872/A20145), BBSRC (grant BB/K008374/1) and TENOVUS Scotland. S.W.G.T. is a Royal Society University Research Fellow. J.L. was supported, in part, by the University of Lyon and by fellowships from Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer and Hospices Civils de Lyon. G.I. was supported by an EMBO long-term postdoctoral fellowship (ALTF 55–2013). E.G. was supported by a Cancer Research UK studentship. F.T. and F.E. were supported by the Emmy Noether program and the CRC746 of the German Research Council (Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG) and the Centre for Biological Signalling Studies (BIOSS, EXC-294). We thank Andrew Keith, Billy Clark, Tom Gilbey, (Beatson Institute) Monica Hou and Catriona Thompson (University of Glasgow) for technical assistance. We thank Abbvie Pharmaceuticals for providing BH3 mimetics. We thank Fabien Llambi (St Jude Children's Research Hospital) and Catherine Winchester (Beaston Institute) for reviewing the manuscript.

Author contributions

S.W.G.T. devised the concept of the mito-priming method and together with J.L. developed the research plan. J.L., M.B. and J.S.R. carried out the majority of research described herein, assisted in parts by G.I. and T.R. using novel reagents developed and characterized by E.G. D.R.G. provided invaluable reagents. F.T. and F.E. carried out the mitochondrial permeabilization assays. A.O. provided intellectual input and together with J.L. and S.W.G.T. wrote the manuscript.

Additional information

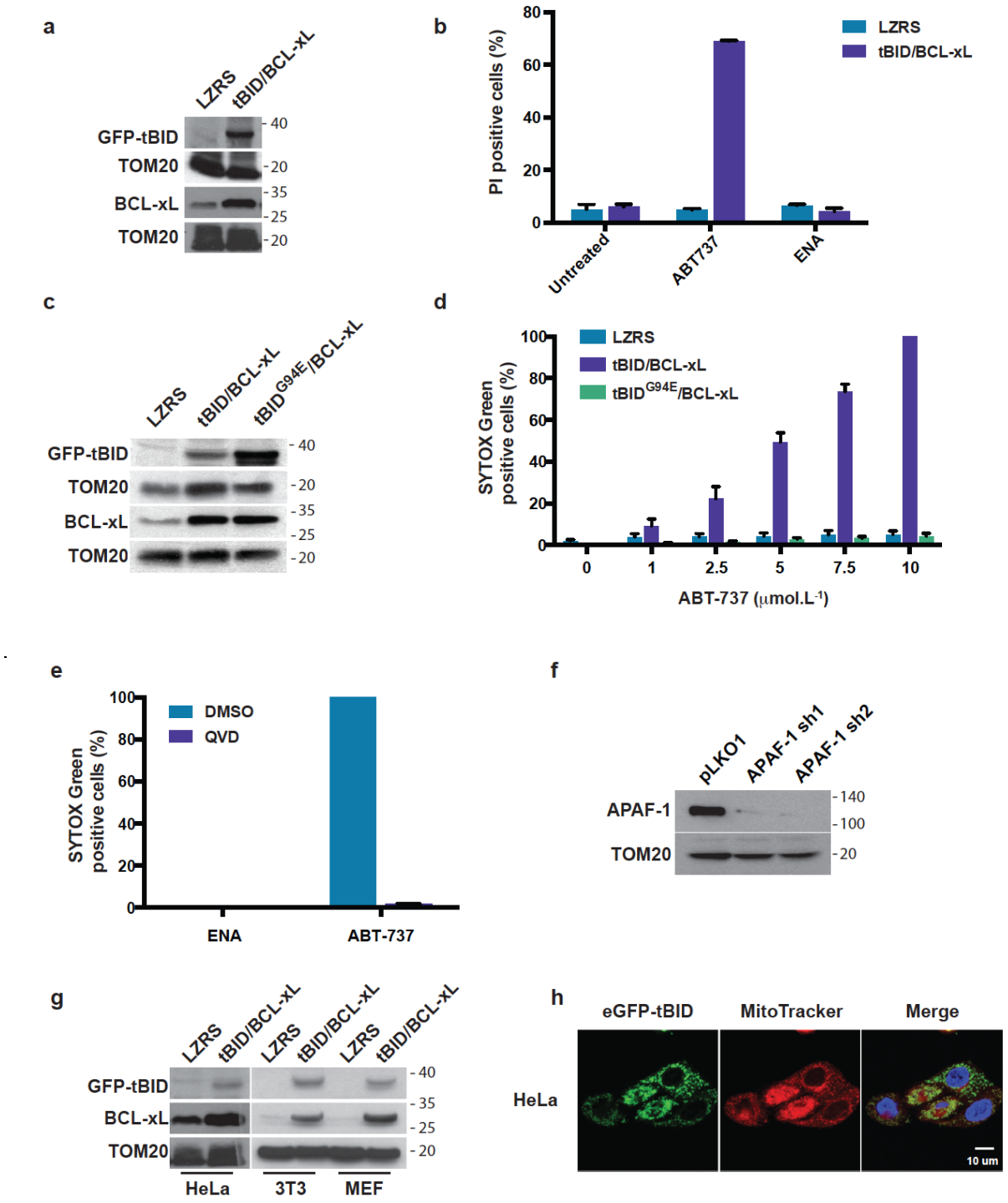
Supplementary Information accompanies this paper at http://www.nature.com/naturecommunications

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/

How to cite this article: Lopez, J. *et al.* Mito-priming as a method to engineer Bcl-2 addiction *Nat. Commun.* 7:10538 doi: 10.1038/ncomms10538 (2016).

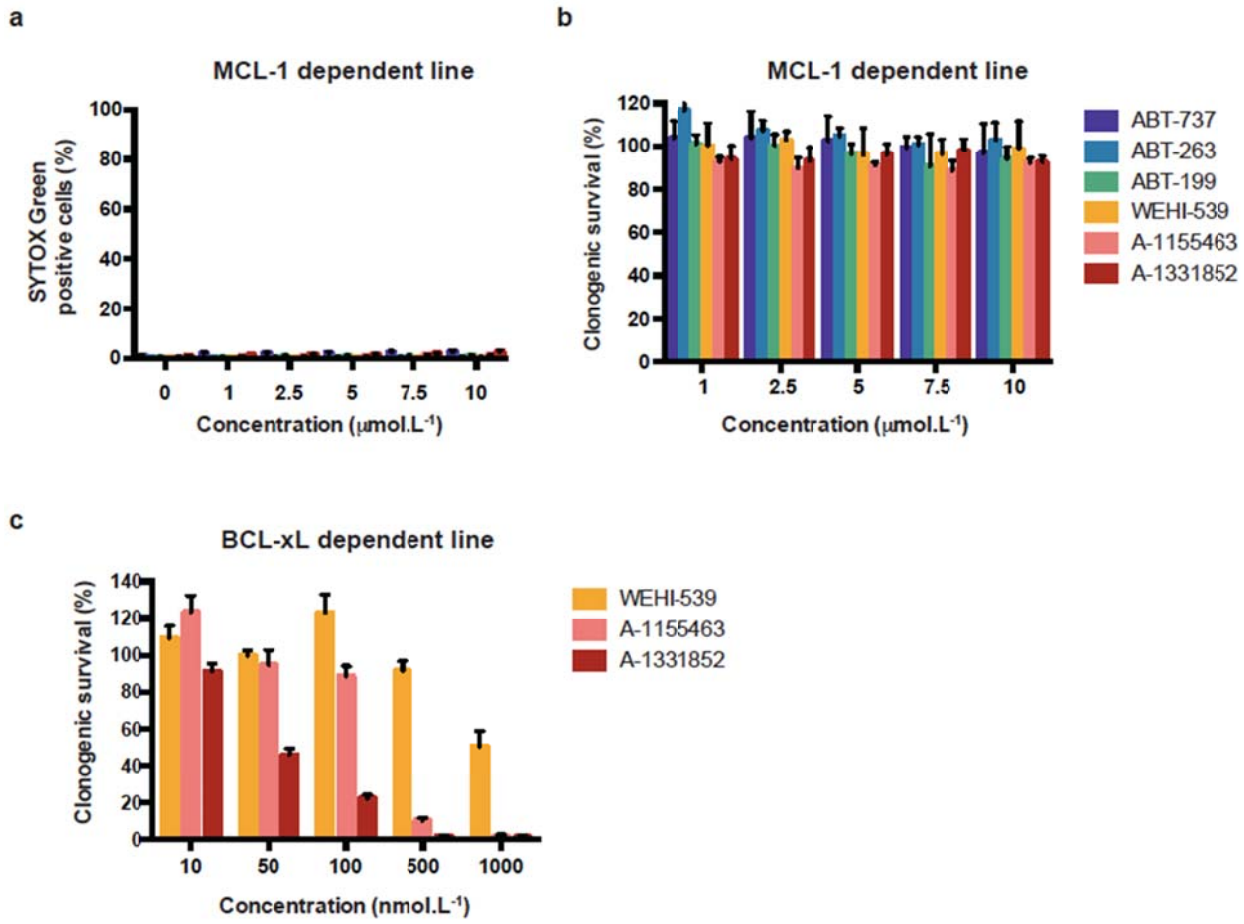
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



Supplementary Figure 1 (related to Figure 1)

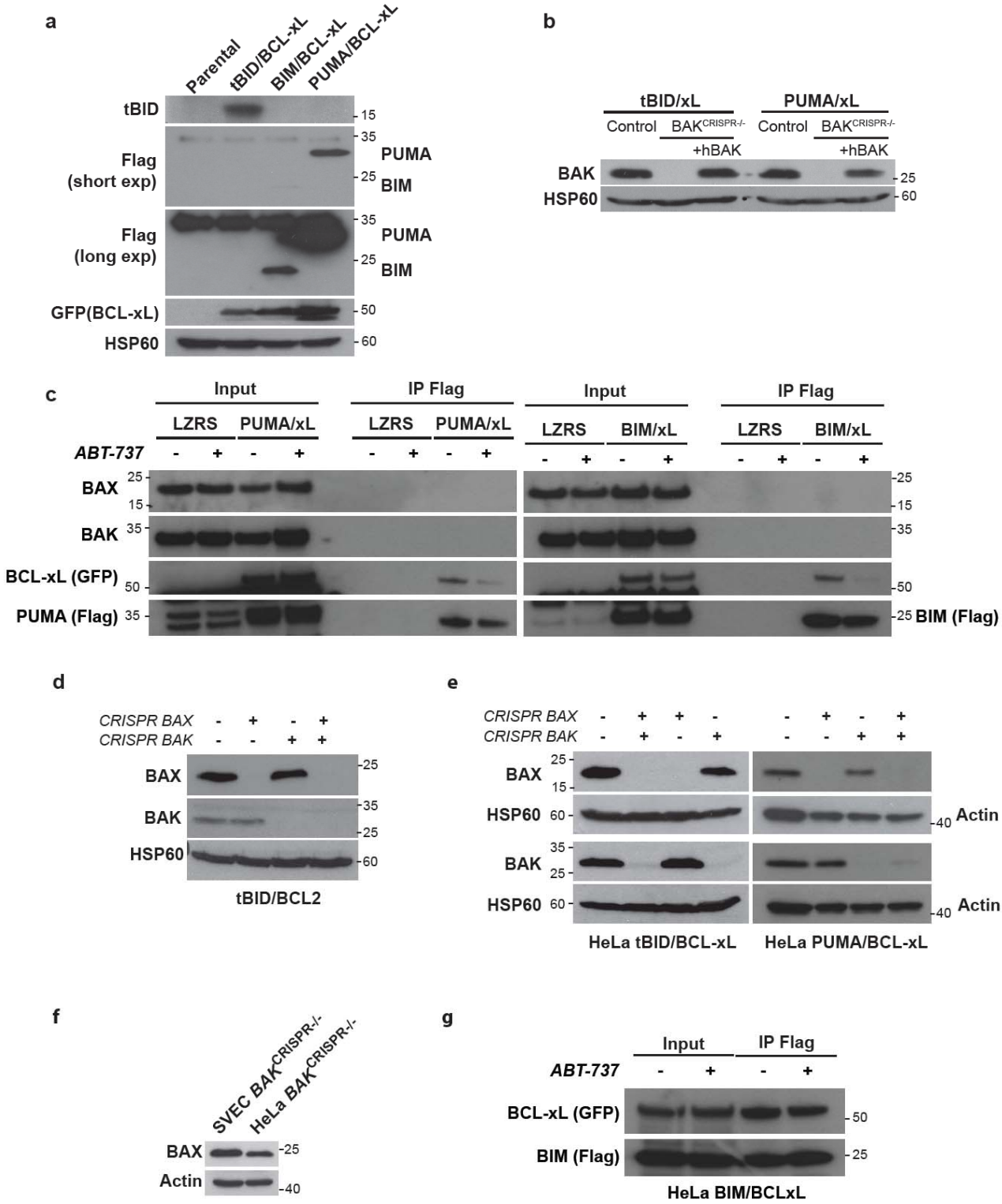
a. SVEC cells stably expressing eGFP-tBID-2A-BCL-xL were analysed by Western blot for expression of eGFP-tBID and BCL-xL. TOM20 was used as a loading control. **b.** SVEC cells stably expressing eGFP-tBID-2A-BCL-xL were treated 16 hours with either 10 µmol.L^{-1} ABT-737 or its inactive enantiomer (ENA) and Propidium iodide positive cells were quantified by flow-cytometry. Error bars represent the SD of triplicate samples from a representative experiment carried out twice independently. **c.** SVEC cells stably

expressing eGFP-tBID-2A-BCL-xL or eGFP-tBID(G94E)-2A-BCL-xL were analysed by Western blot for expression of eGFP-tBID and BCL-xL. TOM20 was used as a loading control. **d.** SVEC cells stably expressing empty vector (LZRS), eGFP-tBID-2A-BCL-xL or eGFP-tBID(G94E)-2A-BCL-xL were treated with increasing concentration of ABT-737 ($\mu mol.L^{-1}$). Error bars represent the SEM of 3 independent experiments. **e.** SVEC cells stably expressing eGFP-tBID-2A-BCL-xL were treated with enantiomer (ENA) or ABT-737 in the presence or absence of Q-VD-OPh (30 $\mu mol.L^{-1}$), cell viability was measured 8 hours later by SYTOX Green exclusion using an IncuCyte imaging system. 100% cell death was set-up as the maximal ABT-737-induced death in absence of Q-VD-OPh. **f.** SVEC cells stably expressing empty vector eGFP-tBID-2A-BCL-xL together with empty vector or two different shRNA constructs targeting APAF-1 were analysed by Western blot for APAF-1 expression. TOM20 was probed as a loading control. **g.** HeLa, 3T3-SA and MEF E1A/RAS stably expressing LZRS vector or eGFP-tBID-2A-BCL-xL were analysed by Western blot for expression of eGFP-tBID and BCL-xL. TOM20 was probed as a loading control. **h.** HeLa cells stably expressing eGFP-tBID-2A-BCL-xL were stained with MitoTracker Deep Red and analysed by confocal microscopy. Scale bar represents 10 μm.



Supplementary Figure 2 (related to Figure 2)

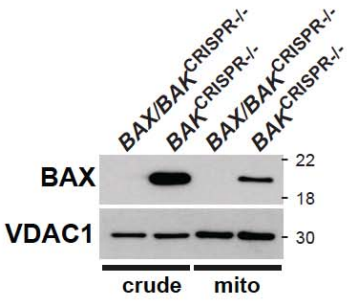
a. SVEC cells stably expressing eGFP-tBID-2A-MCL-1 (MCL-1 dependent line) were treated with increasing concentrations of different BH3 mimetics and analysed for cell viability 24 hours post-treatment using SYTOX Green exclusion and IncuCyte-based cell imaging. Percentage cell death was calculated following normalisation to 24 hours 1 µmol.L^{-1} Actinomycin D treatment. Error bars represent the SEM of 3 independent experiments. **b.** MCL-1 dependent SVEC cells were treated with increasing concentrations of the indicated BH3 mimetics and analysed for long-term viability by clonogenic survival assay. **c.** BCL-xL dependent line was treated with increasing concentrations of the indicated BH3 mimetics and analysed for long-term viability by clonogenic survival assay. For (**b**) and (**c**): Error bars represent the SD of triplicate samples from a representative experiment carried out twice independently. 100% survival: survival in the untreated control.



Supplementary Figure 3 (related to Figure 4)

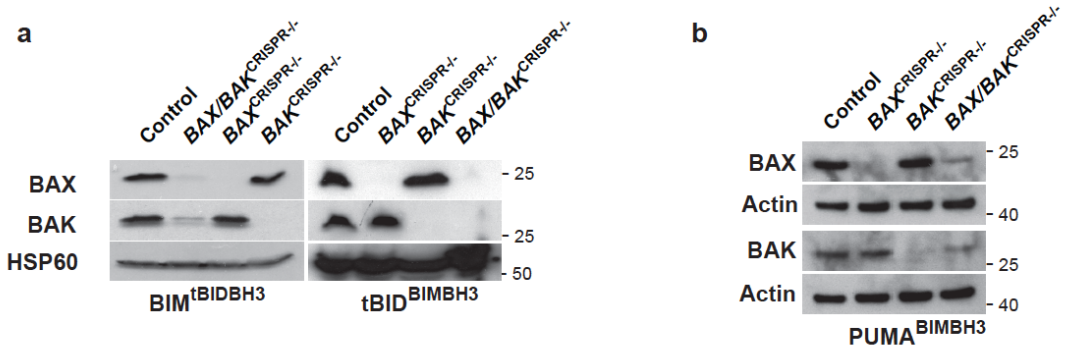
a. SVEC cells stably expressing FLAG-tBID, FLAG-BIM or FLAG-PUMA 2A GFP-BCL-xL were analysed by Western blot for expression of the indicated proteins. Short and long exposures of anti-FLAG blots are shown, due to lack of detection with anti-FLAG antibody, FLAG-tBID was detected with anti-BID antibody. HSP60 was probed as a loading control. **b.** *BAK*$^{CRISPR\ -/-}$ lines stably expressing tBID or PUMA-

2A-GFP-BCL-xL were transduced with empty vector or vector encoding human BAK. Cells were analysed for BAK expression by Western blot. HSP60 was probed as a loading control. **c.** Flag-PUMA or Flag-BIM were immunoprecipitated from the corresponding mito-primed SVEC lines in presence or absence of ABT-737. Interaction with eGFP-BCL-xL, BAX or BAK was assayed by Western blot. **d.** BCL-2 dependent SVEC cells were transduced with CRISPR vector targeting *BAX* and/or *BAK* were analysed for BAX/BAK expression by Western blot. HSP60 was probed as a loading control. **e.** Control, *BAX*, *BAK* or *BAX/BAK*$^{\text{CRISPR -/-}}$ HeLa cells stably expressing GFP-tBID or GFP-PUMA-2A-BCL-xL were analysed for BAX and BAK expression by Western blot. HSP60 was probed as a loading control. **f.** BAX expression in SVEC and HeLa *BAK*$^{\text{CRISPR-/-}}$ cells was compared by Western blot. Actin was used as a loading control. **g.** Flag-BIM was immunoprecipitated from HeLa BIM/BCL-xL line in presence or absence of ABT-737. Interaction with eGFP-BCL-xL was assayed by Western blot.



Supplementary Figure 4 (related to Figure 5)

Whole cell lysates (crude) or mitochondria enriched extracts (mito) from BAX/BAK or BAK deleted SVEC cells stably expressing eGFP-tBid-2A-BCL-xL were probed for BAX and VDAC expression by Western blot.



Supplementary Figure 5 (related to Figure 6)

a. Control, *BAX*, *BAK* or *BAX/BAK*$^{CRISPR\ -/-}$ SVEC cells stably expressing eGFP-BIM$^{tBID\ BH3}$-2A-BCL-xL or eGFP-BID$^{BIM\ BH3}$-2A-BCL-xL were analysed by Western blot for BAX and BAK expression. Actin was probed as a loading control**. b.** As in a. but for PUMA/BIM swap.

.

Discussion

Les protéines de la famille Bcl-2 exercent des fonctions cellulaires variées, en plus de leurs fonctions apoptotiques. En particulier, notre équipe a montré que les orthologues de la famille Bcl-2 chez le poisson zèbre régulent les flux calciques au niveau du RE (Nrz) ou de la mitochondrie (Bcl-wav) et qu'une expression réduite de ces facteurs conduit à des défauts de développement embryonnaire (Popgeorgiev et al., 2011; Prudent et al., 2013). Chez l'Homme, de la même façon que pour le poisson zèbre, des études de plus en plus nombreuses indiquent que la fonction des protéines Bcl-2 en absence de stress cellulaire n'est pas restreinte au seul contrôle de l'apoptose (Gross and Katz, 2017).
Ces fonctions alternatives peuvent être mises en évidence lors de contextes particuliers, telles que l'étude des pathologies. Par exemple, la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL dans les cancers du sein augmente l'invasion ganglionnaire et le nombre de métastases, deux processus en partie gouvernés par la capacité des cellules à se déplacer. Nous avons de ce fait cherché à savoir si Bcl-xL pouvait contrôler la migration cellulaire. Nos travaux sur des modèles de lignées cellulaires mammaires montrent que Bcl-xL régit la migration cellulaire, et ce de façon indépendante de son activité anti-apoptotique. De plus, seule la protéine Bcl-xL mitochondriale et non la protéine réticulaire régule la migration, mettant en évidence l'importance de la localisation subcellulaire des protéines Bcl-2 pour leur fonction. A la mitochondrie, les interactions de Bcl-xL avec les autres membres de la famille Bcl-2 ne sont pas impliquées dans la migration. En revanche, l'interaction entre le canal mitochondrial VDAC et le domaine BH4 de Bcl-xL semble être un déterminant majeur dans le contrôle de la migration cellulaire par Bcl-xL.

A. Bcl-xL contrôle la migration cellulaire

Nous observons que le KD et le KO de Bcl-xL dans les cellules mammaires diminue leur capacité à migrer de façon individuelle et non-directionnelle. De façon originale, nous nous sommes basés sur des expériences de tracking de cellules individuelles. Ce système simple comporte des avantages par rapport à d'autres dispositifs expérimentaux : le fait de suivre les cellules individuellement permet de ne pas prendre en compte les cellules qui meurent en cours d'expérience. Par comparaison avec le test de la blessure (scratch assay), le tracking est indépendant de la prolifération cellulaire et permet ainsi d'observer exclusivement le phénomène de migration.
Dans d'autres systèmes expérimentaux, le rôle de Bcl-xL dans le contrôle de la migration a également été mis en évidence. Ainsi, le KD de Bcl-2, Mcl-1 ou Bcl-xL par la technique d'interférence ARN a été réalisé dans deux lignées cellulaires de cancers colorectaux. Les cellules ont ensuite été soumises au

test de la blessure, à des temps de 24, 48 et 72h (Koehler et al., 2013). Ce test peut être considéré comme un test de migration aléatoire car les cellules à confluence migrent pour combler la brèche sans pour autant être soumises à une migration dirigée. A 48h et 72h après la blessure, la brèche se comble dans la condition où les cellules sont transfectées avec l'ARNsi contrôle, alors qu'elle n'est pas totalement refermée pour les cellules Bcl-2, Mcl-1 ou Bcl-xL KD. Les auteurs suggèrent que les trois gènes exercent donc un effet sur la migration cellulaire, étant donné que par ailleurs, le KD n'affecte pas la prolifération cellulaire. A 24h après la blessure en revanche, on n'observe pas de différence entre les conditions contrôle et test, contrairement à ce que nous observons en tracking. La différence de système expérimental explique vraisemblablement ce constat.

Nous avons essentiellement testé l'effet de Bcl-xL sur la migration cellulaire dans un contexte non-directionnel, or les cellules en migration peuvent aussi être soumises à des stimuli qui dirigent le mouvement cellulaire. Parmi les tests in vitro de migration dirigée, le système de la chambre de Boyden est très classiquement utilisé. Nous avons effectué ce test sur les cellules Hs578T KD pour Bcl-xL en appliquant un gradient de sérum. Là encore, les cellules KD passent moins nombreuses à travers la membrane que les cellules contrôle. Dans le même système expérimental, des MEFs surexprimant Bcl-xL sont plus nombreuses à passer la membrane (Choi et al., 2016). Ce résultat renforce nos observations, puisque la surexpression de Bcl-xL a ici l'effet inverse de la perte d'expression totale ou partielle de cette protéine.

En dernier lieu, nous avons évalué la capacité de nos cellules KO pour Bcl-xL à se déplacer dans un environnement en trois dimensions. Pour cela, nous avons utilisé le modèle d'invasion chez le poisson zèbre, test alternatif à celui des xénogreffes chez la souris (Teng et al., 2013). Contrairement au modèle chez la souris, le test sur poisson zèbre est rapide et peut être réalisé sur un grand nombre d'individus. De façon intéressante, les cellules injectées dans le vitellus se déplacent principalement dans la queue. Or à ce stade développement, la queue est une des régions où la vasculature est la mieux développée. De plus, il n'est pas rare d'observer 48h après injection des groupes de cellules proches ou au sein des vaisseaux, ce qui suggère que les cellules empruntent les vaisseaux sanguins pour envahir la queue de l'embryon. Chez l'Homme, les cellules cancéreuses se dispersent dans l'organisme en empruntant le réseau sanguin ou lymphatique. De ce fait le modèle d'invasion en poisson zèbre semble bien récapituler cette propriété. En co-injectant à ratio égal les cellules KO et les cellules contrôle dans le vitellus des embryons, nous avons observé que 48h après injection, les cellules contrôle s'étaient davantage dispersées du site d'injection que les cellules KO pour Bcl-xL. Ce résultat corrobore nos observations *in vitro*, cette fois dans un environnement en trois dimensions. Ceci suggère qu'en plus

de réduire la migration en deux dimensions, le KO de Bcl-xL diminue l'invasion de notre modèle cellulaire dans un contexte *in vivo*.

En ce qui concerne les mécanismes par lesquels Bcl-xL contrôle spécifiquement l'invasion, il a été montré que Bcl-2 ou Bcl-w activaient l'expression des protéines MMP, qui une fois sécrétées dégradent la matrice extracellulaire et facilitent ainsi la progression des cellules (Bae et al., 2006; Wick et al., 1998). Il est donc possible que Bcl-xL agisse sur l'invasion de la même façon. On pourrait vérifier cette hypothèse en mesurant l'expression des MMP dans nos lignées cellulaires contrôle ou KO pour Bcl-xL grâce à la technique de PCR quantitative.

La protéine Bcl-xL active-t-elle la transition épithélio-mésenchymateuse ?

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est le mécanisme par lequel une cellule épithéliale acquiert un phénotype mésenchymateux. La cellule épithéliale est non motile et fortement ancrée aux cellules voisines par des jonctions adhérentes. Au contraire, le phénotype mésenchymateux se caractérise par des cellules individualisées ayant perdu leur polarité apico-basale et capables de migrer. L'EMT se produit au cours du développement embryonnaire et serait dans certains cas à l'origine de la formation de métastases. Certaines études ont ainsi établi un lien entre Bcl-2 et l'EMT. Par exemple, la surexpression de Bcl-2 provoque une transition épithélio-mésenchymateuse marquée par une acquisition des marqueurs mésenchymateux vimentine et N-cadhérine et la perte de marqueurs épithéliaux telle que la E-cadhérine (An et al., 2015; Zuo et al., 2010).

Nous avons montré que Bcl-xL active la migration des cellules cancéreuses, elle pourrait donc, comme Bcl-2, provoquer un mécanisme de type EMT. De fait, la surexpression de Bcl-xL dans une lignée murine pancréatique donne des cellules de morphologie plus allongée et diminue l'expression de la E-cadhérine, suggérant que les cellules subissent une transition épithélio-mésenchymateuse. De plus, Bcl-xL augmente l'expression du TGFbéta, un régulateur de l'EMT (Choi et al., 2016). Ces résultats révèlent que Bcl-xL pourrait contrôler la migration cellulaire en induisant une EMT. Néanmoins, nos résultats indiquent que ce n'est probablement pas le seul mécanisme par lequel Bcl-xL contrôle la migration des cellules. En effet, nous observons des défauts de migration engendrés par la perte de Bcl-xL dans des cellules qui sont déjà de phénotype mésenchymateux. De plus, les cellules KD ou KO pour Bcl-xL gardent leur forme mésenchymateuse et ne semblent pas subir de transition mésenthélio-épithéliale, phénomène inverse de l'EMT. Enfin, la fonction de Bcl-xL dans l'induction de l'EMT est dû à une localisation nucléaire de la protéine (Choi et al., 2016). Or, dans notre système expérimental,

nous montrons l'importance de la localisation mitochondriale de Bcl-xL dans le contrôle de la migration.

B. Indépendance vis-à-vis de l'apoptose

Bcl-xL ayant été largement décrit pour sa fonction anti-apoptotique, nous avons cherché à savoir si l'effet de Bcl-xL sur la migration était découplé de l'effet sur l'apoptose. En effet, en inhibant Bcl-xL on aurait pu observer un déficit de migration qui soit simplement dû à une induction de la mort cellulaire. Le fait d'avoir choisi la méthode du tracking où seules les cellules vivantes sont suivies a permis de discriminer partiellement les deux effets.
Lorsqu'on utilise des ARNsi ciblant Bcl-xL, on observe une faible proportion de cellules qui meurent avec l'ARNsi n°2. Afin d'empêcher cet effet, nous avons réalisé les expériences de tracking en présence d'un inhibiteur de caspases. Nous avons alors constaté que les cellules KD pour Bcl-xL migraient moins vite que les cellules contrôle, même en présence de l'inhibiteur des caspases. De ce fait, le contrôle de la migration exercé par Bcl-xL est au moins en partie indépendant de sa fonction apoptotique. Ce résultat est rendorcé par d'autres observations rapportées par Weiler et collègues. Dans cette étude, un modèle de cellules de gliomes dont l'expression de Bcl-xL est induite par traitement à la doxycycline a été généré. Les cellules traitées trois jours à la doxycycline ont peu de capacités invasives en chambre de Boyden, alors que les cellules traitées 21 jours sont cinq fois plus nombreuses à envahir la membrane. Par ailleurs, les cellules induites 3 jours et 21 jours à la doxycycline montrent la même résistance à la mort induite par la staurosporine. Ainsi, Bcl-xL augmente l'invasion cellulaire de façon probablement indépendante de son activité anti-apoptotique. De plus, la différence de comportement invasif entre les cellules induites 3 jours et celles induites 21 jours suggère que dans ce modèle le rôle de Bcl-xL sur l'invasion cellulaire est un effet à plus long terme (Weiler et al., 2006).

Suite à cette expérience avec l'inhibiteur des caspases, nous avons traité les cellules Hs578T avec des composés BH3-mimétiques à spectre large (ABT737 et ABT263) ou spécifiques de Bcl-xL (wehi539). Les BH3 mimétiques se lient à la poche hydrophobe de Bcl-xL et de ce fait entrent en compétition avec les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 vis-à-vis de l'interaction avec Bcl-xL. L'utilisation de BH3-mimétiques nous permet donc de tester l'impact d'une perte d'interaction de Bcl-xL endogène avec les autres membres de la famille Bcl-2. De façon intéressante, aucun des BH3 mimétiques utilisés n'a d'effet sur la migration cellulaire. Ainsi, les interactions de Bcl-xL avec les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 ne régulent pas la migration cellulaire. Il s'agit donc d'un argument supplémentaire en faveur de l'indépendance de la fonction de migration par rapport à la fonction apoptotique. En particulier, la poche hydrophobe de Bcl-xL ne semble pas jouer de rôle dans la régulation de la

migration cellulaire. Ce résultat est confirmé par ceux obtenus dans les lignées cellulaires colorectales, où Koehler et collègues observent que le traitement des cellules avec l'ABT737 n'a pas d'effet sur la migration mesurée par le test de la blessure. Curieusement, l'obatoclax a lui un effet inhibiteur sur la migration des cellules colorectales (Koehler et al., 2014). Cependant, le mécanisme exact par lequel l'obatoclax inhibe les anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est encore débattu. En effet, si ce composé a été et est encore considéré comme un BH3 mimétique, certains auteurs proposent que l'obatoclax inhibe les anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 de façon indirecte, et non par interaction avec la poche hydrophobe ; alors que l'ABT737 se comporte bien comme un BH3-mimétique dans leur système expérimental (Albershardt et al., 2011).

Par ailleurs, d'autres arguments étayent la thèse de l'importance mineure de la poche hydrophobe de Bcl-xL dans le contrôle de la migration. Ainsi, Choi et collègues utilisent deux mutants de Bcl-xL : le mutant G138A et le triple mutant GRI/ELN (acides aminés 138 à 140). Ces mutations de la poche hydrophobe sont bien caractérisées pour leur effet inhibiteur sur la liaison du domaine BH3 des pro-apoptotiques à la poche hydrophobe (Cheng et al., 1996). Les deux mutants surexprimés dans les MEFs activent la migration des cellules, avec la même efficacité que Bcl-xL sauvage (Choi et al., 2016). Par conséquent, dans cet autre modèle, la poche hydrophobe de Bcl-xL n'a pas d'effet sur la migration.

C. Localisation réticulaire de Bcl-xL

Par des expériences de fractionnement subcellulaire, nous observons que Bcl-xL endogène est présente dans les cellules Hs578T au niveau des mitochondries mais également au RE. Or classiquement, Bcl-xL est considérée comme étant localisée exclusivement à la mitochondrie alors que Bcl-2 se retrouve à la mitochondrie et au RE (Krajewski et al., 1993). De plus, certaines études justifiaient cette assertion par des différences en acides aminés au sein des domaines C-terminaux des deux protéines. Notamment, des acides aminés de Bcl-xL situés en amont de son domaine transmembranaire diffèrent de ceux présents chez Bcl-2 et seraient responsables de la localisation mitochondriale de Bcl-xL (Kaufmann et al., 2003). Cependant, au regard d'autres données de la littérature, il ne paraît pas aberrant de retrouver Bcl-xL au RE. En effet, de nombreuses interactions directes entre Bcl-xL et des protéines réticulaires ont été décrites, notamment avec le récepteur à l'IP3 (White et al., 2005), le récepteur à la ryanodine (Vervliet et al., 2015). Bcl-xL s'associe également à la protéine réticulaire Bap31, au sein d'un complexe impliquant la pro-caspase 8 (Ng and Shore, 1998).

Par ailleurs, nous détectons Bcl-xL au sein de la fraction MAM (Mitochondria-associated Membranes). Ces régions de contact étroit entre mitochondries et réticulum endoplasmique sont le lieu d'échanges entre les deux organites et notamment d'échanges de calcium. Etant donné que Bcl-xL interagit avec

IP3R et VDAC, et que tous deux forment un complexe au niveau des MAMs, il n'est pas étonnant de détecter Bcl-xL dans cette fraction. Récemment, Williams et collègues observent qu'une proportion de Bcl-xL est présente au niveau des MAMs de la lignée cellulaire CHO. Bcl-xL y régule le transfert de calcium depuis le RE vers la mitochondrie, ce qui justifie fonctionnellement la présence de Bcl-xL au niveau de ce compartiment (Williams et al., 2016).

D. Contribution du pool mitochondrial de Bcl-xL à la migration cellulaire

Etant donné que Bcl-xL est présent au niveau des mitochondries et du RE dans notre modèle d'étude, nous avons posé la question de l'importance de la localisation subcellulaire de Bcl-xL pour le contrôle de la migration cellulaire. En effet, il a été précédemment montré que Bcl-2 mais également Bcl-xL exerçaient des fonctions distinctes, selon leur localisation subcellulaire (Eno et al., 2012; Wang et al., 2001). Nous avons donc émis l'hypothèse que dans notre système, la contribution des formes mitochondriales et réticulaires de Bcl-xL vis-à-vis de la migration pouvait être différentiable.
Afin de tester cette possibilité, nous avons utilisé des expériences de sauvetage au cours desquelles la protéine Bcl-xL sauvage, spécifiquement ciblée à la mitochondrie ou au RE ont été réexprimées dans les cellules Hs578T KO pour Bcl-xL. De façon intéressante, la protéine Bcl-xL sauvage reconstitue partiellement la capacité des cellules à migrer, de même que la protéine mitochondriale. En revanche, la protéine réticulaire ne restaure pas le phénotype induit par le KO de Bcl-xL endogène. Ainsi, la localisation subcellulaire de Bcl-xL est déterminante pour le contrôle de la migration cellulaire et c'est la protéine mitochondriale qui exerce cette fonction.
En absence de stress, nous montrons que Bcl-xL mitochondriale contrôle la migration cellulaire. Ce résultat est comparable à ceux obtenus par Fouqué et collègues en conditions de stress cellulaire. Dans leur système expérimental, la migration cellulaire est activée par traitement des cellules avec une forme clivée de Fas ligand. Dans ces conditions, l'activation de la migration dûe à Fas ligand clivé s'effectue par l'intermédiaire de Bcl-xL mitochondriale (Fouqué et al., 2016). Néanmoins, le mécanisme sous-jacent semble différent de celui que nous proposons, puisque dans cette étude le rôle de Bcl-xL est au moins en partie dépendant des interactions avec les autres membres de la famille Bcl-2, et notamment des interactions de Bcl-xL avec Bad ou Bid.

Nous avons ensuite cherché quelles pouvaient être à la mitochondrie les fonctions de Bcl-xL qui pourraient impacter la migration cellulaire. Les expériences réalisées avec les composés BH3-mimétiques indiquent que les interactions Bcl-xL avec les autres membres de la famille Bcl-2 ne sont

pas impliquées dans la migration. Dès lors, nous avons recherché quel autre effet de Bcl-xL à la mitochondrie pouvait contribuer à la migration.

De façon remarquable, le KO de Bcl-xL dans les cellules Hs578T augmente l'entrée de calcium mitochondrial, ce qui suggère que Bcl-xL module l'homéostasie calcique dans les cellules Hs578T. De plus, le calcium a été depuis longtemps décrit comme un régulateur de la migration cellulaire (Prevarskaya et al., 2011). Nous avons donc émis l'hypothèse que Bcl-xL pouvait contrôler la migration à la mitochondrie par un mécanisme impliquant la régulation des flux calciques mitochondriaux au niveau du canal VDAC. En effet, Bcl-xL est un important régulateur de l'activité de ce canal (Shimizu et al., 1999; Vander Heiden et al., 2001). De plus, plusieurs études ont montré que Bcl-xL interagit et contrôle VDAC par l'intermédiaire de son domaine BH4 (Monaco et al., 2015; Shimizu et al., 2000). Or, nous avions conclu précédemment que la poche hydrophobe de Bcl-xL était sans lien avec la migration cellulaire. Il se trouve que le domaine BH4 ne fait pas partie de cette poche hydrophobe. VDAC semble donc être un candidat intéressant pour l'exploration du mécanisme par lequel Bcl-xL contrôle la migration.

Nous avons alors développé des approches basées sur l'utilisation du seul domaine BH4 de Bcl-xL sur notre modèle cellulaire. Nous avons fait synthétiser un peptide correspondant à la séquence du domaine BH4 de Bcl-xL, ainsi qu'un peptide contrôle comportant les mêmes acides que le peptide BH4 mais disposés dans un ordre aléatoire (peptide « scrambled »). Pour déterminer la séquence de ces peptides, nous nous sommes référés au travail de Monaco et collègues (Monaco et al., 2015). Afin de faciliter la l'entrée des peptides dans les cellules, nous avons ajouté en amont une séquence TAT minimale ainsi qu'un linker. Enfin, les peptides ont été couplés au fluorophore Tétra-méthyl-rhodamine. De façon intéressante, les peptides ainsi synthétisés pénètrent dans la quasi-totalité des cellules. De plus, le peptide BH4 reproduit les résultats obtenus avec la lignée Bcl-xL KO. En effet, le peptide BH4 diminue la migration par rapport au peptide scr et augmente l'entrée de calcium mitochondrial. Comme le peptide BH4 a été décrit comme étant capable d'interagir avec le canal VDAC mais pas le peptide scr (Monaco et al., 2015), nous pensons que le peptide BH4 entre en compéttion avec la protéine Bcl-xL endogène pour lier VDAC, mimant ainsi le phénotype des cellules KO pour Bcl-xL. Des expériences sont en cours de réalisation afin de valider cette assertion dans notre système expérimental.

Nous proposons ici que le domaine BH4 de Bcl-xL régule la migration cellulaire, par la modulation de l'activité du canal VDAC. Ce mécanisme pourrait expliquer la différence de comportement des tumeurs mammaires vis-à-vis de l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL. En effet, nous avons montré que Bcl-2 n'est pas surexprimé et confère un bon pronostic, alors que Bcl-xL est surexprimé dans les tumeurs et est associé

à davantage d'invasion lymphatique. De surcroit, les domaines BH4 de Bcl-xL et de Bcl-2 diffèrent sur plusieurs points, ainsi que je l'ai discuté dans mon introduction bibliographique. En premier lieu, Bcl-2 interagit avec IP3R via son domaine BH4, ce qui n'est pas le cas pour Bcl-xL. Cette différence est due à une variation d'un seul acide aminé entre les deux domaines : la lysine 17 du BH4 de Bcl-2 correspond à une asparagine 11 sur Bcl-xL et cette modification définit la capacité de chaque domaine à interagir ou non avec le récepteur à l'IP3 (Monaco et al., 2012b). En second lieu, seul le domaine BH4 de Bcl-xL et pas celui de Bcl-2 peut moduler l'activité du canal VDAC (Monaco et al., 2013). L'ensemble de ces données indique que les domaines BH4 de Bcl-2 et Bcl-xL sont fonctionnellement distincts. Ces deux domaines n'auraient donc potentiellement pas le même effet sur la migration, ce qui explique les différences obtenues pour les tumeurs mammaires surexprimant Bcl-2 ou Bcl-xL.

Hypothèses alternatives sur le mécanisme par lequel Bcl-xL contrôle la migration

Au-delà de la première hypothèse impliquant le canal VDAC et la régulation du calcium mitochondrial, Bcl-xL pourrait exercer d'autres fonctions à la mitochondrie impliquées dans la régulation de la migration, et ce de façon non-exclusive. Ainsi, Bcl-xL est un important régulateur du métabolisme mitochondrial, à la fois via le contrôle de l'entrée de calcium dans la mitochondrie mais aussi de façon indépendante à ce processus. Par exemple, l'équipe d'Elizabeth Jonas a découvert que Bcl-xL active directement l'activité de l'ATP synthase dans les neurones (Alavian et al., 2011). Il n'est donc pas exclu que Bcl-xL exerce la même fonction dans notre modèle cellulaire. Au préalable, tester cette hypothèse nécessiterait de vérifier la présence de Bcl-xL au niveau de la membrane mitochondriale interne, localisation que nous n'avons pas recherchée au cours de ma thèse. De plus, on pourrait comparer l'ATP produit par les cellules contrôle et les cellules KO pour Bcl-xL, ce qui donnerait une première piste quant à la validité de cette hypothèse dans notre système expérimental.

Enfin, Bcl-xL semble également réguler la dynamique mitochondriale (Berman et al., 2009). Or, il a été observé que les mitochondries des cellules mammaires à haut potentiel migratoire sont plus fragmentées et que les cellules surexpriment Drp1. De façon intéressante, le KD de Drp1 induit par interférence ARN réduit la capacité migratoire des cellules, suggérant que la fragmentation mitochondriale accroit la migration cellulaire (Zhao et al., 2013). Ainsi que je l'ai mentionné dans l'introduction, Bcl-xL interagit avec Drp1 dans les neurones (Li et al., 2013). Il est donc envisageable que cette interaction se produise également dans les cellules mammaires et qu'elle puisse contribuer à réguler la migration cellulaire. Dans notre modèle cellulaire, nous n'avons pas observé de différences de morphologie mitochondriale entre les cellules contrôle et les cellules KO pour Bcl-xL, sur cellules fixées et marquées avec la sonde Mitotracker. Cette observation n'exclut néanmoins pas que le KO de

Bcl-xL puisse modifier la dynamique mitochondriale. Des observations de mitochondries sur cellules vivantes permettraient de clarifier en partie le rôle de Bcl-xL sur la dynamique mitochondriale dans notre modèle. De même, il serait intéressant de tester si Drp1 et Bcl-xL interagissent dans les celllules mammaires, commes elles le font dans les neurones.

Conclusion et perspectives

Mon travail de thèse m'a permis d'explorer les fonctions non-canoniques des protéines Bcl-2. Nous avons montré que Bcl-xL contrôle la migration cellulaire, ce qui corrèle avec une plus grande invasion des ganglions lymphatiques chez les patientes atteintes d'un cancer du sein surexprimant Bcl-xL. En termes mécanistiques, nos données indiquent que le contrôle de la migration exercé par Bcl-xL s'effectue via un mécanisme indépendant de l'apoptose. Mes travaux soulignent de plus l'importance de la localisation subcellulaire des protéines Bcl-2. En effet, bien que présente à la mitochondrie et au RE, seule la protéine Bcl-xL mitochondriale est capable de réguler la migration cellulaire. Enfin, l'utilisation de peptides dérivés du domaine BH4 de Bcl-xL révèle que ce domaine contrôle la migration cellulaire. Les données de la littérature sur ce domaine suggèrent que Bcl-xL active la migration cellulaire par interaction avec le canal mitochondrial VDAC, interaction impliquant le domaine BH4 de Bcl-xL.

Le rôle du domaine BH4 de Bcl-xL dans la migration cellulaire pourrait se révéler important pour la conception de nouveaux traitements ciblant les protéines Bcl-2. En effet, en ciblant spécifiquement ce domaine, on pourrait découpler en partie la fonction de migration et la fonction anti-apoptotique, limitant ainsi la progression tumorale sans engendrer de thrombocytopénie (effet secondaire des BH3-mimétiques ciblant Bcl-xL). Le ciblage thérapeutique des protéines Bcl-2 au niveau de leur domaine BH4 en est encore à ses débuts et concerne surtout Bcl-2 (Han et al., 2015) ou Nrh (travaux de notre équipe). Néanmoins, il constitue une nouvelle façon d'envisager l'inhibition des protéines Bcl-2 qui présente un potentiel prometteur.

Comme je l'ai montré au cours de ma thèse et en lien avec ce qui a été précédemment décrit par notre équipe et d'autres, les protéines Bcl-2 exercent vraisemblablement des fonctions différentes selon le compartiment cellulaire où elles sont présentes. Afin d'explorer davantage ce concept, nous avons conçu des modèles murins transgéniques knock-in conditionnelles, où le gène *Bcl-x* a été ciblé exclusivement à la mitochondrie (souris Kim) ou au RE (souris Kir). Dans ces modèles, la séquence du domaine transmembranaire de Bcl-xL a été remplacée par celle de la protéine ActA (mitochondrie) ou CB5 (RE), de façon identique aux constructions utilisées pendant ma thèse.

Le développement embryonnaire des souris Kim et Kir sera analysé afin de déterminer la part respective de Bcl-xL mitochondrial ou réticulaire dans la formation des différents organes.

Les souris seront aussi croisées avec des modèles de souris transgéniques prédisposées au développement tumoral, de façon à comprendre la contribution de la forme mitochondriale ou réticulaire de Bcl-xL dans le développement et la progression des tumeurs, et ce dans un contexte *in vivo*.

Bibliographie

Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., and Akey, C.W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. Mol. Cell *9*, 423–432.

Aguilar-Cuenca, R., Juanes-García, A., and Vicente-Manzanares, M. (2014). Myosin II in mechanotransduction: master and commander of cell migration, morphogenesis, and cancer. Cell. Mol. Life Sci. *71*, 479–492.

Ahn, T., Yun, C.-H., Kim, H.-R., and Chae, H.-J. (2010). Cardiolipin, phosphatidylserine, and BH4 domain of Bcl-2 family regulate Ca2+/H+ antiporter activity of human Bax inhibitor-1. Cell Calcium *47*, 387–396.

Akao, Y., Otsuki, Y., Kataoka, S., Ito, Y., and Tsujimoto, Y. (1994). Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. Cancer Res. *54*, 2468–2471.

Akin, O., and Mullins, R.D. (2008). Capping Protein Increases the Rate of Actin-Based Motility by Promoting Filament Nucleation by the Arp2/3 Complex. Cell *133*, 841–851.

Alavian, K.N., Li, H., Collis, L., Bonanni, L., Zeng, L., Sacchetti, S., Lazrove, E., Nabili, P., Flaherty, B., Graham, M., et al. (2011). Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. Nat. Cell Biol. *13*, 1224–1233.

Alavian, K.N., Beutner, G., Lazrove, E., Sacchetti, S., Park, H.-A., Licznerski, P., Li, H., Nabili, P., Hockensmith, K., Graham, M., et al. (2014). An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, 10580–10585.

Albershardt, T.C., Salerni, B.L., Soderquist, R.S., Bates, D.J.P., Pletnev, A.A., Kisselev, A.F., and Eastman, A. (2011). Multiple BH3 Mimetics Antagonize Antiapoptotic MCL1 Protein by Inducing the Endoplasmic Reticulum Stress Response and Up-regulating BH3-only Protein NOXA. J. Biol. Chem. *286*, 24882–24895.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell (Garland Science).

An, J., Lv, J., Li, A., Qiao, J., Fang, L., Li, Z., Li, B., Zhao, W., Chen, H., and Wang, L. (2015). Constitutive expression of Bcl-2 induces epithelial-Mesenchymal transition in mammary epithelial cells. BMC Cancer *15*, 476.

Andreu-Fernández, V., García-Murria, M.J., Bañó-Polo, M., Martin, J., Monticelli, L., Orzáez, M., and Mingarro, I. (2016). The C-terminal Domains of Apoptotic BH3-only Proteins Mediate Their Insertion into Distinct Biological Membranes. J. Biol. Chem. *291*, 25207–25216.

Annis, M.G., Soucie, E.L., Dlugosz, P.J., Cruz-Aguado, J.A., Penn, L.Z., Leber, B., and Andrews, D.W. (2005). Bax forms multispanning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. EMBO J. *24*, 2096–2103.

Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J.J., Mazzei, G., et al. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. Science *277*, 370–372.

Aouacheria, A., Arnaud, E., Venet, S., Lalle, P., Gouy, M., Rigal, D., and Gillet, G. (2001). Nrh, a human homologue of Nr-13 associates with Bcl-Xs and is an inhibitor of apoptosis. Oncogene *20*, 5846–5855.

Aouacheria, A., Combet, C., Tompa, P., and Hardwick, J.M. (2015). Redefining the BH3 Death Domain as a "Short Linear Motif." Trends Biochem. Sci. *40*, 736–748.

Arbel, N., and Shoshan-Barmatz, V. (2010). Voltage-dependent Anion Channel 1-based Peptides Interact with Bcl-2 to Prevent Antiapoptotic Activity. J. Biol. Chem. *285*, 6053–6062.

Arbel, N., Ben-Hail, D., and Shoshan-Barmatz, V. (2012). Mediation of the antiapoptotic activity of Bcl-xL protein upon interaction with VDAC1 protein. J. Biol. Chem. *287*, 23152–23161.

Ashkenazi, A., Fairbrother, W.J., Leverson, J.D., and Souers, A.J. (2017). From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. Nat. Rev. Drug Discov.

Bae, I.H., Park, M.-J., Yoon, S.H., Kang, S.W., Lee, S.-S., Choi, K.-M., and Um, H.-D. (2006). Bcl-w Promotes Gastric Cancer Cell Invasion by Inducing Matrix Metalloproteinase-2 Expression via Phosphoinositide 3-Kinase, Akt, and Sp1. Cancer Res. *66*, 4991–4995.

Bae, I.H., Yoon, S.H., Lee, S.B., Park, J.K., Ho, J.-N., and Um, H.-D. (2009). Signaling components involved in Bcl-w-induced migration of gastric cancer cells. Cancer Lett. *277*, 22–28.

Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L., and Korsmeyer, S.J. (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. Cell *41*, 899–906.

Banaszynski, L.A., Chen, L., Maynard-Smith, L.A., Ooi, A.G.L., and Wandless, T.J. (2006). A Rapid, Reversible, and Tunable Method to Regulate Protein Function in Living Cells Using Synthetic Small Molecules. Cell *126*, 995–1004.

Barboule, N., Truchet, I., and Valette, A. (2005). Localization of phosphorylated forms of Bcl-2 in mitosis: co-localization with Ki-67 and nucleolin in nuclear structures and on mitotic chromosomes. Cell Cycle Georget. Tex *4*, 590–596.

Bassik, M.C., Scorrano, L., Oakes, S.A., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2004). Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca2+ homeostasis and apoptosis. EMBO J. *23*, 1207–1216.

Báthori, G., Csordás, G., Garcia-Perez, C., Davies, E., and Hajnóczky, G. (2006). Ca2+-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC). J. Biol. Chem. *281*, 17347–17358.

Baughman, J.M., Perocchi, F., Girgis, H.S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C.A., Sancak, Y., Bao, X.R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R.L., et al. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. Nature *476*, 341–345.

Bear, J.E., and Haugh, J.M. (2014). Directed migration of mesenchymal cells: where signaling and the cytoskeleton meet. Curr. Opin. Cell Biol. *30*, 74–82.

Bender, T., and Martinou, J.-C. (2013). Where Killers Meet—Permeabilization of the Outer Mitochondrial Membrane during Apoptosis. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *5*, a011106.

Berman, S.B., Chen, Y., Qi, B., McCaffery, J.M., Rucker, E.B., Goebbels, S., Nave, K.-A., Arnold, B.A., Jonas, E.A., Pineda, F.J., et al. (2009). Bcl-xL increases mitochondrial fission, fusion, and biomass in neurons. J. Cell Biol. *184*, 707–719.

Beroukhim, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., et al. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. Nature *463*, 899–905.

Bisi, S., Disanza, A., Malinverno, C., Frittoli, E., Palamidessi, A., and Scita, G. (2013). Membrane and actin dynamics interplay at lamellipodia leading edge. Curr. Opin. Cell Biol. *25*, 565–573.

Boise, L.H., González-García, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nuñez, G., and Thompson, C.B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. Cell *74*, 597–608.

Bonneau, B., Prudent, J., Popgeorgiev, N., and Gillet, G. (2013). Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: the calcium connection. Biochim. Biophys. Acta *1833*, 1755–1765.

Bonneau, B., Nougarède, A., Prudent, J., Popgeorgiev, N., Peyriéras, N., Rimokh, R., and Gillet, G. (2014). The Bcl-2 homolog Nrz inhibits binding of IP3 to its receptor to control calcium signaling during zebrafish epiboly. Sci. Signal. *7*, ra14.

Bonneau, B., Ando, H., Kawaai, K., Hirose, M., Takahashi-Iwanaga, H., and Mikoshiba, K. (2016). IRBIT controls apoptosis by interacting with the Bcl-2 homolog, Bcl2l10, and by promoting ER-mitochondria contact. ELife *5*.

Bouchalova, K., Svoboda, M., Kharaishvili, G., Vrbkova, J., Bouchal, J., Trojanec, R., Koudelakova, V., Radova, L., Cwiertka, K., Hajduch, M., et al. (2015). BCL2 is an independent predictor of outcome in basal-like triple-negative breast cancers treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med. *36*, 4243–4252.

Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D.C., Tarlinton, D.M., Kay, T.W., Köntgen, F., Adams, J.M., and Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. Science *286*, 1735–1738.

Brady, H.J., Gil-Gómez, G., Kirberg, J., and Berns, A.J. (1996). Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. EMBO J. *15*, 6991–7001.

Brien, G., Debaud, A.-L., Robert, X., Oliver, L., Trescol-Biemont, M.-C., Cauquil, N., Geneste, O., Aghajari, N., Vallette, F.M., Haser, R., et al. (2009). C-terminal residues regulate localization and function of the antiapoptotic protein Bfl-1. J. Biol. Chem. *284*, 30257–30263.

Brouwer, J.M., Westphal, D., Dewson, G., Robin, A.Y., Uren, R.T., Bartolo, R., Thompson, G.V., Colman, P.M., Kluck, R.M., and Czabotar, P.E. (2014). Bak Core and Latch Domains Separate during Activation, and Freed Core Domains Form Symmetric Homodimers. Mol. Cell *55*, 938–946.

Brundage, R.A., Fogarty, K.E., Tuft, R.A., and Fay, F.S. (1991). Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. Science *254*, 703–706.

Carpio, M.A., Michaud, M., Zhou, W., Fisher, J.K., Walensky, L.D., and Katz, S.G. (2015). BCL-2 family member BOK promotes apoptosis in response to endoplasmic reticulum stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, 7201–7206.

Cartron, P.-F., Priault, M., Oliver, L., Meflah, K., Manon, S., and Vallette, F.M. (2003). The N-terminal end of Bax contains a mitochondrial-targeting signal. J. Biol. Chem. *278*, 11633–11641.

Case, L.B., and Waterman, C.M. (2015). Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. Nat. Cell Biol. *17*, 955–963.

Cekanova, M., Fernando, R.I., Siriwardhana, N., Sukhthankar, M., Parra, C. de la, Woraratphoka, J., Malone, C., Ström, A., Baek, S.J., Wade, P.A., et al. (2015). BCL-2 family protein, BAD is down-regulated in breast cancer and inhibits cell invasion. Exp. Cell Res. *331*, 1–10.

Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A., and Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. Cancer Cell *9*, 351–365.

Chapeau, E.A., Gembarska, A., Durand, E.Y., Mandon, E., Estadieu, C., Romanet, V., Wiesmann, M., Tiedt, R., Lehar, J., de Weck, A., et al. (2017). Resistance mechanisms to TP53-MDM2 inhibition identified by in vivo piggyBac transposon mutagenesis screen in an Arf(-/-) mouse model. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.

Chen, Z.X., and Pervaiz, S. (2007). Bcl-2 induces pro-oxidant state by engaging mitochondrial respiration in tumor cells. Cell Death Differ. *14*, 1617–1627.

Chen, Z.X., and Pervaiz, S. (2009). Involvement of cytochrome c oxidase subunits Va and Vb in the regulation of cancer cell metabolism by Bcl-2. Cell Death Differ. *17*, 408–420.

Chen, D.F., Schneider, G.E., Martinou, J.-C., and Tonegawa, S. (1997). Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS. Nature *385*, 434–439.

Chen, H.-C., Kanai, M., Inoue-Yamauchi, A., Tu, H.-C., Huang, Y., Ren, D., Kim, H., Takeda, S., Reyna, D.E., Chan, P.M., et al. (2015). An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family. Nat. Cell Biol.

Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. Mol. Cell *17*, 393–403.

Chen, R., Valencia, I., Zhong, F., McColl, K.S., Roderick, H.L., Bootman, M.D., Berridge, M.J., Conway, S.J., Holmes, A.B., Mignery, G.A., et al. (2004). Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. J. Cell Biol. *166*, 193–203.

Chen, Y., Aon, M.A., Hsu, Y.-T., Soane, L., Teng, X., McCaffery, J.M., Cheng, W.-C., Qi, B., Li, H., Alavian, K.N., et al. (2011). Bcl-xL regulates mitochondrial energetics by stabilizing the inner membrane potential. J. Cell Biol. *195*, 263–276.

Cheng, E.H., Levine, B., Boise, L.H., Thompson, C.B., and Hardwick, J.M. (1996). Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. Nature *379*, 554–556.

Cheng, E.H.Y., Sheiko, T.V., Fisher, J.K., Craigen, W.J., and Korsmeyer, S.J. (2003). VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. Science *301*, 513–517.

Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. Cell *81*, 505–512.

Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. (2010). The BCL-2 family reunion. Mol. Cell *37*, 299–310.

Choi, S., Chen, Z., Tang, L.H., Fang, Y., Shin, S.J., Panarelli, N.C., Chen, Y.-T., Li, Y., Jiang, X., and Du, Y.-C.N. (2016). Bcl-xL promotes metastasis independent of its anti-apoptotic activity. Nat. Commun. *7*, 10384.

Chou, J.J., Li, H., Salvesen, G.S., Yuan, J., and Wagner, G. (1999). Solution Structure of BID, an Intracellular Amplifier of Apoptotic Signaling. Cell *96*, 615–624.

Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 13944–13949.

Clark, A.G., and Vignjevic, D.M. (2015). Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. Curr. Opin. Cell Biol. *36*, 13–22.

Cosentino, K., and García-Sáez, A.J. (2016). Bax and Bak Pores: Are We Closing the Circle? Trends Cell Biol.

Cramer, L.P. (2013). Mechanism of cell rear retraction in migrating cells. Curr. Opin. Cell Biol. *25*, 591–599.

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. (2013). Bax Crystal Structures Reveal How BH3 Domains Activate Bax and Nucleate Its Oligomerization to Induce Apoptosis. Cell *152*, 519–531.

Danial, N.N., Gramm, C.F., Scorrano, L., Zhang, C.-Y., Krauss, S., Ranger, A.M., Robert Datta, S., Greenberg, M.E., Licklider, L.J., Lowell, B.B., et al. (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. Nature *424*, 952–956.

De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., and Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. Nature *476*, 336–340.

De Stefani, D., Bononi, A., Romagnoli, A., Messina, A., De Pinto, V., Pinton, P., and Rizzuto, R. (2012). VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca2+ signals to mitochondria. Cell Death Differ. *19*, 267–273.

Delbridge, A.R.D., and Strasser, A. (2015). The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. Cell Death Differ. *22*, 1071–1080.

Delbridge, A.R.D., Grabow, S., Strasser, A., and Vaux, D.L. (2016). Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. Nat. Rev. Cancer *16*, 99–109.

Déliot, N., and Constantin, B. (2015). Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. Biochim. Biophys. Acta *1848*, 2512–2522.

Deng, H., Yu, F., Chen, J., Zhao, Y., Xiang, J., and Lin, A. (2008). Phosphorylation of Bad at Thr-201 by JNK1 Promotes Glycolysis through Activation of Phosphofructokinase-1. J. Biol. Chem. *283*, 20754–20760.

Deng, J., Carlson, N., Takeyama, K., Dal Cin, P., Shipp, M., and Letai, A. (2007). BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. Cancer Cell *12*, 171–185.

Denoyelle, C., Lambert, B., Meryet-Figuière, M., Vigneron, N., Brotin, E., Lecerf, C., Abeilard, E., Giffard, F., Louis, M.-H., Gauduchon, P., et al. (2014). miR-491-5p-induced apoptosis in ovarian carcinoma depends on the direct inhibition of both BCL-XL and EGFR leading to BIM activation. Cell Death Dis. *5*, e1445.

Dewson, G., Kratina, T., Sim, H.W., Puthalakath, H., Adams, J.M., Colman, P.M., and Kluck, R.M. (2008). To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions. Mol. Cell *30*, 369–380.

D'Orsi, B., Engel, T., Pfeiffer, S., Nandi, S., Kaufmann, T., Henshall, D.C., and Prehn, J.H.M. (2016). Bok Is Not Pro-Apoptotic But Suppresses Poly ADP-Ribose Polymerase-Dependent Cell Death Pathways and Protects against Excitotoxic and Seizure-Induced Neuronal Injury. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *36*, 4564–4578.

Dremina, E.S., Sharov, V.S., Kumar, K., Zaidi, A., Michaelis, E.K., and Schöneich, C. (2004). Anti-apoptotic protein Bcl-2 interacts with and destabilizes the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase (SERCA). Biochem. J. *383*, 361–370.

Du, Y.-C.N., Lewis, B.C., Hanahan, D., and Varmus, H. (2007a). Assessing tumor progression factors by somatic gene transfer into a mouse model: Bcl-xL promotes islet tumor cell invasion. PLoS Biol. *5*, e276.

Du, Y.-C.N., Lewis, B.C., Hanahan, D., and Varmus, H. (2007b). Assessing tumor progression factors by somatic gene transfer into a mouse model: Bcl-xL promotes islet tumor cell invasion. PLoS Biol. *5*, e276.

Duan, Y., He, Q., Yue, K., Si, H., Wang, J., Zhou, X., and Wang, X. (2016). Hypoxia induced Bcl-2/Twist1 complex promotes tumor cell invasion in oral squamous cell carcinoma. Oncotarget.

Echeverry, N., Bachmann, D., Ke, F., Strasser, A., Simon, H.U., and Kaufmann, T. (2013). Intracellular localization of the BCL-2 family member BOK and functional implications. Cell Death Differ. *20*, 785–799.

Eckenrode, E.F., Yang, J., Velmurugan, G.V., Foskett, J.K., and White, C. (2010). Apoptosis protection by Mcl-1 and Bcl-2 modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent Ca2+ signaling. J. Biol. Chem. *285*, 13678–13684.

Edelblum, K.L., Yan, F., Yamaoka, T., and Polk, D.B. (2006). Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. Inflamm. Bowel Dis. *12*, 413–424.

Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Kirschner, M.W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. Nature *418*, 790–793.

Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-xL Retrotranslocates Bax from the Mitochondria into the Cytosol. Cell *145*, 104–116.

Eno, C.O., Eckenrode, E.F., Olberding, K.E., Zhao, G., White, C., and Li, C. (2012). Distinct roles of mitochondria- and ER-localized Bcl-xL in apoptosis resistance and Ca2+ homeostasis. Mol. Biol. Cell *23*, 2605–2618.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2001). Integrin-Mediated Activation of Cdc42 Controls Cell Polarity in Migrating Astrocytes through PKCζ. Cell *106*, 489–498.

Fan, G., Baker, M.L., Wang, Z., Baker, M.R., Sinyagovskiy, P.A., Chiu, W., Ludtke, S.J., and Serysheva, I.I. (2015). Gating machinery of InsP3R channels revealed by electron cryomicroscopy. Nature *527*, 336–341.

Fannjiang, Y., Kim, C.-H., Huganir, R.L., Zou, S., Lindsten, T., Thompson, C.B., Mito, T., Traystman, R.J., Larsen, T., Griffin, D.E., et al. (2003). BAK Alters Neuronal Excitability and Can Switch from Anti- to Pro-Death Function during Postnatal Development. Dev. Cell *4*, 575–585.

Fernández, Y., España, L., Mañas, S., Fabra, A., and Sierra, A. (2000). Bcl-xL promotes metastasis of breast cancer cells by induction of cytokines resistance. Cell Death Differ. *7*, 350–359.

Filadi, R., Theurey, P., and Pizzo, P. (2017). The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in heath and disease: Molecules, functions and significance. Cell Calcium.

Finkel, T., Menazza, S., Holmström, K.M., Parks, R.J., Liu, J., Sun, J., Liu, J., Pan, X., and Murphy, E. (2015). The ins and outs of mitochondrial calcium. Circ. Res. *116*, 1810–1819.

Fogh, B.S., Multhaupt, H.A.B., and Couchman, J.R. (2014). Protein kinase C, focal adhesions and the regulation of cell migration. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. *62*, 172–184.

Fouqué, A., Lepvrier, E., Debure, L., Gouriou, Y., Malleter, M., Delcroix, V., Ovize, M., Ducret, T., Li, C., Hammadi, M., et al. (2016). The apoptotic members CD95, BclxL, and Bcl-2 cooperate to promote cell migration by inducing Ca(2+) flux from the endoplasmic reticulum to mitochondria. Cell Death Differ. *23*, 1702–1716.

Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. Nat. Rev. Cancer *3*, 362–374.

Fuchs, Y., and Steller, H. (2011). Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. Cell *147*, 742–758.

Fujita, N., Nagahashi, A., Nagashima, K., Rokudai, S., and Tsuruo, T. (1998). Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-XL protein by caspase-3-like proteases. Oncogene *17*, 1295–1304.

Gandhi, L., Camidge, D.R., Ribeiro de Oliveira, M., Bonomi, P., Gandara, D., Khaira, D., Hann, C.L., McKeegan, E.M., Litvinovich, E., Hemken, P.M., et al. (2011). Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *29*, 909–916.

García-Sáez, A.J., Chiantia, S., Salgado, J., and Schwille, P. (2007). Pore formation by a Bax-derived peptide: effect on the line tension of the membrane probed by AFM. Biophys. J. *93*, 103–112.

Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M.L., Pitter, K., Bird, G.H., Katz, S.G., Tu, H.-C., Kim, H., Cheng, E.H.-Y., Tjandra, N., et al. (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. Nature *455*, 1076–1081.

George, N.M., Evans, J.J.D., and Luo, X. (2007). A three-helix homo-oligomerization domain containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax. Genes Dev. *21*, 1937–1948.

Gerasimenko, J.V., Petersen, O.H., and Gerasimenko, O.V. (2014). Monitoring of intra-ER free Ca2+. Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal. *3*, 63–71.

Germain, M., and Duronio, V. (2007). The N terminus of the anti-apoptotic BCL-2 homologue MCL-1 regulates its localization and function. J. Biol. Chem. *282*, 32233–32242.

Germain, M., and Shore, G.C. (2003). Cellular distribution of Bcl-2 family proteins. Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ. *2003*, pe10.

Germain, M., Mathai, J.P., McBride, H.M., and Shore, G.C. (2005). Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. EMBO J. *24*, 1546–1556.

Giampieri, S., Manning, C., Hooper, S., Jones, L., Hill, C.S., and Sahai, E. (2009). Localized and reversible TGF|[beta]| signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. Nat. Cell Biol. *11*, 1287–1296.

Giménez-Cassina, A., and Danial, N.N. (2015). Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by BCL-2 family proteins. Trends Endocrinol. Metab. *26*, 165–175.

Gincel, D., Zaid, H., and Shoshan-Barmatz, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. Biochem. J. *358*, 147–155.

Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G.D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabó, I., et al. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 5887–5892.

Glab, J.A., Mbogo, G.W., and Puthalakath, H. (2017). BH3-Only Proteins in Health and Disease. Int. Rev. Cell Mol. Biol. *328*, 163–196.

Gligorijevic, B., Bergman, A., and Condeelis, J. (2014). Multiparametric Classification Links Tumor Microenvironments with Tumor Cell Phenotype. PLOS Biol. *12*, e1001995.

Gotow, T., Shibata, M., Kanamori, S., Tokuno, O., Ohsawa, Y., Sato, N., Isahara, K., Yayoi, Y., Watanabe, T., Leterrier, J.F., et al. (2000). Selective localization of Bcl-2 to the inner mitochondrial and smooth endoplasmic reticulum membranes in mammalian cells. Cell Death Differ. *7*, 666–674.

Grashoff, C., Hoffman, B.D., Brenner, M.D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M.T., McLean, M.A., Sligar, S.G., Chen, C.S., Ha, T., et al. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. Nature *466*, 263–266.

Greenberg, E.F., McColl, K.S., Zhong, F., Wildey, G., Dowlati, A., and Distelhorst, C.W. (2015). Synergistic killing of human small cell lung cancer cells by the Bcl-2-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor disruptor BIRD-2 and the BH3-mimetic ABT-263. Cell Death Dis. *6*, e2034.

Gross, A. (2016). BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. *1857*, 1243–1246.

Gross, A., and Katz, S.G. (2017). Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. Cell Death Differ.

Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S.J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. J. Biol. Chem. *274*, 1156–1163.

Große, L., Wurm, C.A., Brüser, C., Neumann, D., Jans, D.C., and Jakobs, S. (2016). Bax assembles into large ring-like structures remodeling the mitochondrial outer membrane in apoptosis. EMBO J.

Guan, J.-J., Zhang, X.-D., Sun, W., Qi, L., Wu, J.-C., and Qin, Z.-H. (2015). DRAM1 regulates apoptosis through increasing protein levels and lysosomal localization of BAX. Cell Death Dis. *6*, e1624.

Guérin, J.-F., Cornut-Thibaut, A., Giscard-Destaing, S., Pouvreau, S., Guillemin, Y., and Aouacheria, A. (2013). Subcellular dynamics of the maternal cell death regulator BCL2L10 in human preimplantation embryos. Hum. Reprod. Oxf. Engl. *28*, 729–739.

Guillemin, Y., Lopez, J., Gimenez, D., Fuertes, G., Valero, J.G., Blum, L., Gonzalo, P., Salgado, J., Girard-Egrot, A., and Aouacheria, A. (2010). Active Fragments from Pro- and Antiapoptotic BCL-2 Proteins Have Distinct Membrane Behavior Reflecting Their Functional Divergence. PLOS ONE *5*, e9066.

Hager, J.H., Ulanet, D.B., Hennighausen, L., and Hanahan, D. (2009). Genetic ablation of Bcl-x attenuates invasiveness without affecting apoptosis or tumor growth in a mouse model of pancreatic neuroendocrine cancer. PloS One *4*, e4455.

Han, B., Park, D., Li, R., Xie, M., Owonikoko, T.K., Zhang, G., Sica, G.L., Ding, C., Zhou, J., Magis, A.T., et al. (2015). Small-Molecule Bcl2 BH4 Antagonist for Lung Cancer Therapy. Cancer Cell *27*, 852–863.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646–674.

Hanson, C.J., Bootman, M.D., Distelhorst, C.W., Wojcikiewicz, R.J.H., and Roderick, H.L. (2008). Bcl-2 suppresses Ca2+ release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and inhibits Ca2+ uptake by mitochondria without affecting ER calcium store content. Cell Calcium *44*, 324–338.

Hardwick, J.M., and Soane, L. (2013). Multiple functions of BCL-2 family proteins. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *5*.

Herrant, M., Jacquel, A., Marchetti, S., Belhacène, N., Colosetti, P., Luciano, F., and Auberger, P. (2004). Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis. Oncogene *23*, 7863–7873.

Hiller, S., Garces, R.G., Malia, T.J., Orekhov, V.Y., Colombini, M., and Wagner, G. (2008). Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles. Science *321*, 1206–1210.

Hockenbery, D., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., and Korsmeyer, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature *348*, 334–336.

Hodge, T., and Colombini, M. (1997). Regulation of Metabolite Flux through Voltage-Gating of VDAC Channels. J. Membr. Biol. *157*, 271–279.

Hoppins, S., Edlich, F., Cleland, M.M., Banerjee, S., McCaffery, J.M., Youle, R.J., and Nunnari, J. (2011). The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic complexes. Mol. Cell *41*, 150–160.

Hosoi, K.-I., Miyata, N., Mukai, S., Furuki, S., Okumoto, K., Cheng, E.H., and Fujiki, Y. (2017). The VDAC2-BAK axis regulates peroxisomal membrane permeability. J. Cell Biol.

Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., and Hsueh, A.J. (1997a). 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. *94*, 12401–12406.

Hsu, Y.T., Wolter, K.G., and Youle, R.J. (1997b). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 3668–3672.

Hu, Q., Wu, D., Chen, W., Yan, Z., Yan, C., He, T., Liang, Q., and Shi, Y. (2014). Molecular determinants of caspase-9 activation by the Apaf-1 apoptosome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, 16254–16261.

Huang, D.C.S., O'Reilly, L.A., Strasser, A., and Cory, S. (1997). The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. EMBO J. *16*, 4628–4638.

Huang, H., Hu, X., Eno, C.O., Zhao, G., Li, C., and White, C. (2013). An interaction between Bcl-xL and the voltage-dependent anion channel (VDAC) promotes mitochondrial Ca2+ uptake. J. Biol. Chem. *288*, 19870–19881.

Huang, H., Shah, K., Bradbury, N.A., Li, C., and White, C. (2014). Mcl-1 promotes lung cancer cell migration by directly interacting with VDAC to increase mitochondrial Ca(2+) uptake and reactive oxygen species generation. Cell Death Dis. *5*, e1482.

Huang, J.-B., Kindzelskii, A.L., Clark, A.J., and Petty, H.R. (2004). Identification of Channels Promoting Calcium Spikes and Waves in HT1080 Tumor Cells. Cancer Res. *64*, 2482–2489.

Huttenlocher, A., Palecek, S.P., Lu, Q., Zhang, W., Mellgren, R.L., Lauffenburger, D.A., Ginsberg, M.H., and Horwitz, A.F. (1997). Regulation of Cell Migration by the Calcium-dependent Protease Calpain. J. Biol. Chem. *272*, 32719–32722.

Hwang, K.-T., Woo, J.W., Shin, H.C., Kim, H.S., Ahn, S.K., Moon, H.-G., Han, W., Park, I.A., and Noh, D.-Y. (2012). Prognostic influence of BCL2 expression in breast cancer. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *131*, E1109-1119.

Inohara, N., Ding, L., Chen, S., and Núñez, G. (1997). harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). EMBO J. *16*, 1686–1694.

Ivanova, H., Ritane, A., Wagner, L., Luyten, T., Shapovalov, G., Welkenhuyzen, K., Seitaj, B., Monaco, G., De Smedt, H., Prevarskaya, N., et al. (2016). The trans-membrane domain of Bcl-2α, but not its hydrophobic cleft, is a critical determinant for efficient IP3 receptor inhibition. Oncotarget.

Iwai, M., Michikawa, T., Bosanac, I., Ikura, M., and Mikoshiba, K. (2007). Molecular Basis of the Isoform-specific Ligand-binding Affinity of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors. J. Biol. Chem. *282*, 12755–12764.

Jacquemet, G., Hamidi, H., and Ivaska, J. (2015). Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. Curr. Opin. Cell Biol. *36*, 23–31.

Janumyan, Y., Cui, Q., Yan, L., Sansam, C.G., Valentin, M., and Yang, E. (2008). G0 Function of BCL2 and BCL-xL Requires BAX, BAK, and p27 Phosphorylation by Mirk, Revealing a Novel Role of BAX and BAK in Quiescence Regulation. J. Biol. Chem. *283*, 34108–34120.

Jonas, E. (2006). BCL-xL regulates synaptic plasticity. Mol. Interv. *6*, 208–222.

Jonas, E.A., Hoit, D., Hickman, J.A., Brandt, T.A., Polster, B.M., Fannjiang, Y., McCarthy, E., Montanez, M.K., Hardwick, J.M., and Kaczmarek, L.K. (2003). Modulation of synaptic transmission by the BCL-2 family protein BCL-xL. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *23*, 8423–8431.

Joy, A., Panicker, S., and Shapiro, J.R. (2000). Altered nuclear localization of bax protein in BCNU-resistant glioma cells. J. Neurooncol. *49*, 117–129.

Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S., and Campone, M. (2013). Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. Nat. Rev. Cancer *13*, 455–465.

Juo, P., Kuo, C.J., Yuan, J., and Blenis, J. (1998). Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. Curr. Biol. CB *8*, 1001–1008.

Karbowski, M., Lee, Y.-J., Gaume, B., Jeong, S.-Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. J. Cell Biol. *159*, 931–938.

Karbowski, M., Norris, K.L., Cleland, M.M., Jeong, S.-Y., and Youle, R.J. (2006). Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. Nature *443*, 658–662.

Karczmarek-Borowska, B., Filip, A., Wojcierowski, J., Smoleń, A., Korobowicz, E., Korszen-Pilecka, I., and Zdunek, M. (2006). Estimation of prognostic value of Bcl-xL gene expression in non-small cell lung cancer. Lung Cancer Amst. Neth. *51*, 61–69.

Kaufmann, T., Schlipf, S., Sanz, J., Neubert, K., Stein, R., and Borner, C. (2003). Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. J. Cell Biol. *160*, 53–64.

Ke, F., Voss, A., Kerr, J.B., O'Reilly, L.A., Tai, L., Echeverry, N., Bouillet, P., Strasser, A., and Kaufmann, T. (2012). BCL-2 family member BOK is widely expressed but its loss has only minimal impact in mice. Cell Death Differ. *19*, 915–925.

Ke, H., Parron, V.I., Reece, J., Zhang, J.Y., Akiyama, S.K., and French, J.E. (2010). BCL2 inhibits cell adhesion, spreading, and motility by enhancing actin polymerization. Cell Res. *20*, 458–469.

Keitel, U., Scheel, A., Thomale, J., Halpape, R., Kaulfuß, S., Scheel, C., and Dobbelstein, M. (2014). Bcl-xL mediates therapeutic resistance of a mesenchymal breast cancer cell subpopulation. Oncotarget *5*.

Khalil, A.A., and Friedl, P. (2010). Determinants of leader cells in collective cell migration. Integr. Biol. *2*, 568–574.

Kim, E.J., and Helfman, D.M. (2003). Characterization of the Metastasis-associated Protein, S100A4 ROLES OF CALCIUM BINDING AND DIMERIZATION IN CELLULAR LOCALIZATION AND INTERACTION WITH MYOSIN. J. Biol. Chem. *278*, 30063–30073.

Kim, E.M., Park, J.K., Hwang, S.-G., and Um, H.-D. (2015). Src and epidermal growth factor receptor mediate the pro-invasive activity of Bcl-w. Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.

Klee, M., Pallauf, K., Alcalá, S., Fleischer, A., and Pimentel-Muiños, F.X. (2009). Mitochondrial apoptosis induced by BH3-only molecules in the exclusive presence of endoplasmic reticular Bak. EMBO J. *28*, 1757–1768.

Knudson, C.M., Tung, K.S., Tourtellotte, W.G., Brown, G.A., and Korsmeyer, S.J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. Science *270*, 96–99.

Ko, J.-K., Lee, M.-J., Cho, S.-H., Cho, J.-A., Lee, B.-Y., Koh, J.S., Lee, S.-S., Shim, Y.-H., and Kim, C.-W. (2003). Bfl-1S, a novel alternative splice variant of Bfl-1, localizes in the nucleus via its C-terminus and prevents cell death. Oncogene *22*, 2457–2465.

Koehler, B.C., Scherr, A.-L., Lorenz, S., Urbanik, T., Kautz, N., Elssner, C., Welte, S., Bermejo, J.L., Jäger, D., and Schulze-Bergkamen, H. (2013). Beyond cell death - antiapoptotic bcl-2 proteins regulate migration and invasion of colorectal cancer cells in vitro. PloS One *8*, e76446.

Koehler, B.C., Scherr, A.-L., Lorenz, S., Elssner, C., Kautz, N., Welte, S., Jaeger, D., Urbanik, T., and Schulze-Bergkamen, H. (2014). Pan-Bcl-2 inhibitor obatoclax delays cell cycle progression and blocks migration of colorectal cancer cells. PloS One *9*, e106571.

Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A.L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G.L., Gong, J.-N., Moujalled, D.M., et al. (2016). The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. Nature *538*, 477–482.

Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., and Craig, R.W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 3516–3520.

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., and Reed, J.C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. Cancer Res. *53*, 4701–4714.

Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., and Dolznig, H. (2013). In vitro cell migration and invasion assays. Mutat. Res. *752*, 10–24.

Krebs, J., Agellon, L.B., and Michalak, M. (2015). Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. Biochem. Biophys. Res. Commun. *460*, 114–121.

Kuo, T.H., Kim, H.R., Zhu, L., Yu, Y., Lin, H.M., and Tsang, W. (1998). Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2. Oncogene *17*, 1903–1910.

Kurokawa, K., and Matsuda, M. (2005). Localized RhoA Activation as a Requirement for the Induction of Membrane Ruffling. Mol. Biol. Cell *16*, 4294–4303.

Kvansakul, M., and Hinds, M.G. (2014). Chapter Three - The Structural Biology of BH3-Only Proteins. In Methods in Enzymology, J.Y. and J.A.W. Avi Ashkenazi, ed. (Academic Press), pp. 49–74.

Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W.D., Czabotar, P.E., Fischer, S.F., Perugini, M.A., Huang, D.C.S., and Colman, P.M. (2008). Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. Cell Death Differ. *15*, 1564–1571.

Langer, C.J., Albert, I., Ross, H.J., Kovacs, P., Blakely, L.J., Pajkos, G., Somfay, A., Zatloukal, P., Kazarnowicz, A., Moezi, M.M., et al. (2014). Randomized phase II study of carboplatin and etoposide with or without obatoclax mesylate in extensive-stage small cell lung cancer. Lung Cancer Amst. Neth. *85*, 420–428.

Lauterwasser, J., Todt, F., Zerbes, R.M., Nguyen, T.N., Craigen, W., Lazarou, M., van der Laan, M., and Edlich, F. (2016). The porin VDAC2 is the mitochondrial platform for Bax retrotranslocation. Sci. Rep. *6*, 32994.

Lavik, A.R., Zhong, F., Chang, M.-J., Greenberg, E., Choudhary, Y., Smith, M.R., McColl, K.S., Pink, J., Reu, F.J., Matsuyama, S., et al. (2015). A synthetic peptide targeting the BH4 domain of Bcl-2 induces apoptosis in multiple myeloma and follicular lymphoma cells alone or in combination with agents targeting the BH3-binding pocket of Bcl-2. Oncotarget.

Lawson, C.D., and Burridge, K. (2014). The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. Small GTPases *5*.

Lawson, M.A., and Maxfield, F.R. (1995). Ca2+- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. Nature *377*, 75–79.

Lawson, C., Lim, S.-T., Uryu, S., Chen, X.L., Calderwood, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2012). FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. J. Cell Biol. *196*, 223–232.

Leber, B., Lin, J., and Andrews, D.W. (2010). Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. Oncogene *29*, 5221–5230.

Lemasters, J.J., Theruvath, T.P., Zhong, Z., and Nieminen, A.-L. (2009). Mitochondrial Calcium and the Permeability Transition in Cell Death. Biochim. Biophys. Acta *1787*, 1395–1401.

Lessene, G., Czabotar, P.E., and Colman, P.M. (2008). BCL-2 family antagonists for cancer therapy. Nat. Rev. Drug Discov. *7*, 989–1000.

Lessene, G., Czabotar, P.E., Sleebs, B.E., Zobel, K., Lowes, K.N., Adams, J.M., Baell, J.B., Colman, P.M., Deshayes, K., Fairbrother, W.J., et al. (2013). Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor. Nat. Chem. Biol. *9*, 390–397.

Leverson, J.D., Phillips, D.C., Mitten, M.J., Boghaert, E.R., Diaz, D., Tahir, S.K., Belmont, L.D., Nimmer, P., Xiao, Y., Ma, X.M., et al. (2015). Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. Sci. Transl. Med. *7*, 279ra40.

Li, J., and Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. Oncogene *27*, 6194–6206.

Li, C., Fox, C.J., Master, S.R., Bindokas, V.P., Chodosh, L.A., and Thompson, C.B. (2002). Bcl-X(L) affects Ca(2+) homeostasis by altering expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 9830–9835.

Li, C., Wang, X., Vais, H., Thompson, C.B., Foskett, J.K., and White, C. (2007). Apoptosis regulation by Bcl-x(L) modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel isoform gating. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 12565–12570.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell *94*, 491–501.

Li, H., Alavian, K.N., Lazrove, E., Mehta, N., Jones, A., Zhang, P., Licznerski, P., Graham, M., Uo, T., Guo, J., et al. (2013). A Bcl-xL-Drp1 complex regulates synaptic vesicle membrane dynamics during endocytosis. Nat. Cell Biol. *15*, 773–785.

Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. Nature *412*, 95–99.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell *91*, 479–489.

Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.-X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., et al. (2000). The Combined Functions of Proapoptotic Bcl-2 Family Members Bak and Bax Are Essential for Normal Development of Multiple Tissues. Mol. Cell *6*, 1389–1399.

Linette, G.P., Li, Y., Roth, K., and Korsmeyer, S.J. (1996). Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 9545–9552.

Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W.G., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. Mol. Cell *44*, 517–531.

Llambi, F., Wang, Y.-M., Victor, B., Yang, M., Schneider, D.M., Gingras, S., Parsons, M.J., Zheng, J.H., Brown, S.A., Pelletier, S., et al. (2016). BOK Is a Non-canonical BCL-2 Family Effector of Apoptosis Regulated by ER-Associated Degradation. Cell *165*, 421–433.

Lopez, J., and Tait, S.W.G. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. Br. J. Cancer *112*, 957–962.

Lopez, J., Bessou, M., Riley, J.S., Giampazolias, E., Todt, F., Rochegüe, T., Oberst, A., Green, D.R., Edlich, F., Ichim, G., et al. (2016). Mito-priming as a method to engineer Bcl-2 addiction. Nat. Commun. *7*, 10538.

Lovell, J.F., Billen, L.P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., and Andrews, D.W. (2008). Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. Cell *135*, 1074–1084.

Lowman, X.H., McDonnell, M.A., Kosloske, A., Odumade, O.A., Jenness, C., Karim, C.B., Jemmerson, R., and Kelekar, A. (2010). The Proapoptotic Function of Noxa in Human Leukemia Cells Is Regulated by the Kinase Cdk5 and by Glucose. Mol. Cell *40*, 823–833.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. Cell *94*, 481–490.

Lüthi, A.U., and Martin, S.J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. Cell Death Differ. *14*, 641–650.

Maeda, N., Niinobe, M., and Mikoshiba, K. (1990). A cerebellar Purkinje cell marker P400 protein is an inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptor protein. Purification and characterization of InsP3 receptor complex. EMBO J. *9*, 61–67.

Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.-C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., et al. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. EMBO J. *26*, 2527–2539.

Mandal, M., Adam, L., Mendelsohn, J., and Kumar, R. (1998). Nuclear targeting of Bax during apoptosis in human colorectal cancer cells. Oncogene *17*, 999–1007.

Martin, S.S., Ridgeway, A.G., Pinkas, J., Lu, Y., Reginato, M.J., Koh, E.Y., Michelman, M., Daley, G.Q., Brugge, J.S., and Leder, P. (2004). A cytoskeleton-based functional genetic screen identifies Bcl-xL as an enhancer of metastasis, but not primary tumor growth. Oncogene *23*, 4641–4645.

Martinou, J.-C., and Youle, R.J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. Dev. Cell *21*, 92–101.

Matapurkar, A., and Lazebnik, Y. (2006). Requirement of cytochrome c for apoptosis in human cells. Cell Death Differ. *13*, 2062–2067.

Mathai, J.P., Germain, M., Marcellus, R.C., and Shore, G.C. (2002). Induction and endoplasmic reticulum location of BIK/NBK in response to apoptotic signaling by E1A and p53. Oncogene *21*, 2534–2544.

Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 446–454.

Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A.S., Dejardin, E., and Green, D.R. (2006). Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis by Destabilization of MCL-1. Mol. Cell *21*, 749–760.

McDonnell, J.M., Fushman, D., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., and Cowburn, D. (1999). Solution Structure of the Proapoptotic Molecule BID: A Structural Basis for Apoptotic Agonists and Antagonists. Cell *96*, 625–634.

Mehlen, P., and Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. Nat. Rev. Cancer *6*, 449–458.

Mérino, D., Khaw, S.L., Glaser, S.P., Anderson, D.J., Belmont, L.D., Wong, C., Yue, P., Robati, M., Phipson, B., Fairlie, W.D., et al. (2012). Bcl-2, Bcl-xL, and Bcl-w are not equivalent targets of ABT-737 and navitoclax (ABT-263) in lymphoid and leukemic cells. Blood *119*, 5807–5816.

Meynet, O., Bénéteau, M., Jacquin, M.A., Pradelli, L.A., Cornille, A., Carles, M., and Ricci, J.-E. (2012). Glycolysis inhibition targets Mcl-1 to restore sensitivity of lymphoma cells to ABT-737-induced apoptosis. Leukemia *26*, 1145–1147.

Meynet, O., Zunino, B., Happo, L., Pradelli, L.A., Chiche, J., Jacquin, M.A., Mondragón, L., Tanti, J.-F., Taillan, B., Garnier, G., et al. (2013). Caloric restriction modulates Mcl-1 expression and sensitizes lymphomas to BH3 mimetic in mice. Blood *122*, 2402–2411.

Michels, J., O'Neill, J.W., Dallman, C.L., Mouzakiti, A., Habens, F., Brimmell, M., Zhang, K.Y., Craig, R.W., Marcusson, E.G., Johnson, P.W., et al. (2004). Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. Oncogene *23*, 4818–4827.

Mikoshiba, K. (2007). IP3 receptor/Ca2+ channel: from discovery to new signaling concepts. J. Neurochem. *102*, 1426–1446.

Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *6*, 56–68.

Mizuguchi, M., Sohma, O., Takashima, S., Ikeda, K., Yamada, M., Shiraiwa, N., and Ohta, S. (1996). Immunochemical and immunohistochemical localization of Bcl-x protein in the rat central nervous system. Brain Res. *712*, 281–286.

Monaco, G., Beckers, M., Ivanova, H., Missiaen, L., Parys, J.B., De Smedt, H., and Bultynck, G. (2012a). Profiling of the Bcl-2/Bcl-X(L)-binding sites on type 1 IP(3) receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. *428*, 31–35.

Monaco, G., Decrock, E., Akl, H., Ponsaerts, R., Vervliet, T., Luyten, T., De Maeyer, M., Missiaen, L., Distelhorst, C.W., De Smedt, H., et al. (2012b). Selective regulation of IP3-receptor-mediated Ca2+ signaling and apoptosis by the BH4 domain of Bcl-2 versus Bcl-Xl. Cell Death Differ. *19*, 295–309.

Monaco, G., Vervliet, T., Akl, H., and Bultynck, G. (2013). The selective BH4-domain biology of Bcl-2-family members: IP3Rs and beyond. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *70*, 1171–1183.

Monaco, G., Decrock, E., Arbel, N., van Vliet, A.R., La Rovere, R., De Smedt, H., Parys, J.B., Agostinis, P., Leybaert, L., Shoshan-Barmatz, V., et al. (2015). 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.

Montero, J., Sarosiek, K.A., DeAngelo, J.D., Maertens, O., Ryan, J., Ercan, D., Piao, H., Horowitz, N.S., Berkowitz, R.S., Matulonis, U., et al. (2015). Drug-induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy. Cell *160*, 977–989.

Montessuit, S., Somasekharan, S.P., Terrones, O., Lucken-Ardjomande, S., Herzig, S., Schwarzenbacher, R., Manstein, D.J., Bossy-Wetzel, E., Basañez, G., Meda, P., et al. (2010). Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. Cell *142*, 889–901.

Morciano, G., Giorgi, C., Balestra, D., Marchi, S., Perrone, D., Pinotti, M., and Pinton, P. (2016). Mcl-1 involvement in mitochondrial dynamics is associated with apoptotic cell death. Mol. Biol. Cell *27*, 20–34.

Morishima, N., Nakanishi, K., Tsuchiya, K., Shibata, T., and Seiwa, E. (2004). Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. J. Biol. Chem. *279*, 50375–50381.

Motoyama, N., Wang, F., Roth, K.A., Sawa, H., Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., and Fujii, S. (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. Science *267*, 1506–1510.

Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., et al. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. Nature *381*, 335–341.

Mund, T., Gewies, A., Schoenfeld, N., Bauer, M.K.A., and Grimm, S. (2003). Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *17*, 696–698.

Murali, A., and Rajalingam, K. (2014). Small Rho GTPases in the control of cell shape and mobility. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *71*, 1703–1721.

Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. Nature *434*, 652–658.

Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Mol. Cell *7*, 683–694.

Nakano, H., Miyazawa, T., Kinoshita, K., Yamada, Y., and Yoshida, T. (2010). Functional screening identifies a microRNA, miR-491 that induces apoptosis by targeting Bcl-X(L) in colorectal cancer cells. Int. J. Cancer *127*, 1072–1080.

Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Shinkai, Y., Louie, M.C., Fields, L.E., Lucas, P.J., Stewart, V., and Alt, F.W. (1993). Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. Science *261*, 1584–1588.

Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.-P., Tong, F., et al. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer Cell *10*, 515–527.

Newton, C.L., Mignery, G.A., and Südhof, T.C. (1994). Co-expression in vertebrate tissues and cell lines of multiple inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptors with distinct affinities for InsP3. J. Biol. Chem. *269*, 28613–28619.

Ng, F.W., and Shore, G.C. (1998). Bcl-XL cooperatively associates with the Bap31 complex in the endoplasmic reticulum, dependent on procaspase-8 and Ced-4 adaptor. J. Biol. Chem. *273*, 3140–3143.

Nguyen, M., Millar, D.G., Yong, V.W., Korsmeyer, S.J., and Shore, G.C. (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. J. Biol. Chem. *268*, 25265–25268.

Nilius, B., and Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. Genome Biol. *12*, 218.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. Science *288*, 1053–1058.

Olopade, O.I., Adeyanju, M.O., Safa, A.R., Hagos, F., Mick, R., Thompson, C.B., and Recant, W.M. (1997). Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. Cancer J. Sci. Am. *3*, 230–237.

Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., et al. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. Nature *435*, 677–681.

Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell *74*, 609–619.

Opferman, J.T. (2008). Apoptosis in the development of the immune system. Cell Death Differ. *15*, 234–242.

O'Reilly, L.A., Huang, D.C., and Strasser, A. (1996). The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. EMBO J. *15*, 6979–6990.

O'Reilly, L.A., Print, C., Hausmann, G., Moriishi, K., Cory, S., Huang, D.C., and Strasser, A. (2001). Tissue expression and subcellular localization of the pro-survival molecule Bcl-w. Cell Death Differ. *8*, 486–494.

Parker, J.S., Mullins, M., Cheang, M.C.U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., et al. (2009). Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. J. Clin. Oncol. *27*, 1160–1167.

Patsialou, A., Bravo-Cordero, J.J., Wang, Y., Entenberg, D., Liu, H., Clarke, M., and Condeelis, J.S. (2013). Intravital multiphoton imaging reveals multicellular streaming as a crucial component of in vivo cell migration in human breast tumors. IntraVital *2*, e25294.

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. Cell *122*, 927–939.

Pécot, J., Maillet, L., Le Pen, J., Vuillier, C., Trécesson, S. de C., Fétiveau, A., Sarosiek, K.A., Bock, F.J., Braun, F., Letai, A., et al. (2016). Tight Sequestration of BH3 Proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes Contributes to Apoptotic Resistance. Cell Rep. *17*, 3347–3358.

Perciavalle, R.M., Stewart, D.P., Koss, B., Lynch, J., Milasta, S., Bathina, M., Temirov, J., Cleland, M.M., Pelletier, S., Schuetz, J.D., et al. (2012). Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. Nat. Cell Biol. *14*, 575–583.

Perocchi, F., Gohil, V.M., Girgis, H.S., Bao, X.R., McCombs, J.E., Palmer, A.E., and Mootha, V.K. (2010). MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. Nature *467*, 291–296.

Pinton, P., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (1998). The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca2+ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. EMBO J. *17*, 5298–5308.

Pinton, P., Ferrari, D., Magalhães, P., Schulze-Osthoff, K., Virgilio, F.D., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (2000). Reduced Loading of Intracellular Ca2+ Stores and Downregulation of Capacitative Ca2+Influx in Bcl-2–Overexpressing Cells. J. Cell Biol. *148*, 857–862.

Poincloux, R., Collin, O., Lizárraga, F., Romao, M., Debray, M., Piel, M., and Chavrier, P. (2011). Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel. Proc. Natl. Acad. Sci. *108*, 1943–1948.

Popgeorgiev, N., Bonneau, B., Ferri, K.F., Prudent, J., Thibaut, J., and Gillet, G. (2011). The apoptotic regulator Nrz controls cytoskeletal dynamics via the regulation of Ca2+ trafficking in the zebrafish blastula. Dev. Cell *20*, 663–676.

Prakriya, M., and Lewis, R.S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. Physiol. Rev. *95*, 1383–1436.

Prevarskaya, N., Skryma, R., and Shuba, Y. (2011). Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. Nat. Rev. Cancer *11*, 609–618.

Priault, M., Camougrand, N., Chaudhuri, B., and Manon, S. (1999). Role of the C-terminal domain of Bax and Bcl-XL in their localization and function in yeast cells. FEBS Lett. *443*, 225–228.

Priault, M., Hue, E., Marhuenda, F., Pilet, P., Oliver, L., and Vallette, F.M. (2010). Differential dependence on Beclin 1 for the regulation of pro-survival autophagy by Bcl-2 and Bcl-xL in HCT116 colorectal cancer cells. PloS One *5*, e8755.

Print, C.G., Loveland, K.L., Gibson, L., Meehan, T., Stylianou, A., Wreford, N., de Kretser, D., Metcalf, D., Köntgen, F., Adams, J.M., et al. (1998). Apoptosis regulator Bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 12424–12431.

Prudent, J., Popgeorgiev, N., Bonneau, B., Thibaut, J., Gadet, R., Lopez, J., Gonzalo, P., Rimokh, R., Manon, S., Houart, C., et al. (2013). Bcl-wav and the mitochondrial calcium uniporter drive gastrula morphogenesis in zebrafish. Nat. Commun. *4*, 2330.

Prudent, J., Popgeorgiev, N., Gadet, R., Deygas, M., Rimokh, R., and Gillet, G. (2016). Mitochondrial Ca(2+) uptake controls actin cytoskeleton dynamics during cell migration. Sci. Rep. *6*, 36570.

Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., and Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. Mol. Cell *3*, 287–296.

Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C., and Strasser, A. (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. Science *293*, 1829–1832.

Qian, S., Wang, W., Yang, L., and Huang, H.W. (2008). Structure of transmembrane pore induced by Bax-derived peptide: evidence for lipidic pores. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 17379–17383.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat. Protoc. *8*, 2281–2308.

Reed, J.C. (2008). Bcl-2–family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. Blood *111*, 3322–3330.

Renault, T.T., Floros, K.V., Elkholi, R., Corrigan, K.-A., Kushnareva, Y., Wieder, S.Y., Lindtner, C., Serasinghe, M.N., Asciolla, J.J., Buettner, C., et al. (2015). Mitochondrial Shape Governs BAX-Induced Membrane Permeabilization and Apoptosis. Mol. Cell *57*, 69–82.

Rinkenberger, J.L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K., and Korsmeyer, S.J. (2000). Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. Genes Dev. *14*, 23–27.

Rong, Y.-P., Aromolaran, A.S., Bultynck, G., Zhong, F., Li, X., McColl, K., Matsuyama, S., Herlitze, S., Roderick, H.L., Bootman, M.D., et al. (2008). Targeting Bcl-2-IP3 receptor interaction to reverse Bcl-2's inhibition of apoptotic calcium signals. Mol. Cell *31*, 255–265.

Rong, Y.-P., Bultynck, G., Aromolaran, A.S., Zhong, F., Parys, J.B., De Smedt, H., Mignery, G.A., Roderick, H.L., Bootman, M.D., and Distelhorst, C.W. (2009). The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 14397–14402.

Rubio-Patiño, C., Bossowski, J.P., Villa, E., Mondragón, L., Zunino, B., Proïcs, E., Chiche, J., Bost, F., Verhoeyen, E., and Ricci, J.-E. (2016). Low carbohydrate diet prevents Mcl-1-mediated resistance to BH3-mimetics. Oncotarget *7*, 73270–73279.

Rupnarain, C., Dlamini, Z., Naicker, S., and Bhoola, K. (2004). Colon cancer: genomics and apoptotic events. Biol. Chem. *385*, 449–464.

Russell, H.R., Lee, Y., Miller, H.L., Zhao, J., and McKinnon, P.J. (2002). Murine ovarian development is not affected by inactivation of the bcl-2 family member diva. Mol. Cell. Biol. *22*, 6866–6870.

Salvador-Gallego, R., Mund, M., Cosentino, K., Schneider, J., Unsay, J., Schraermeyer, U., Engelhardt, J., Ries, J., and García-Sáez, A.J. (2016). Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores. EMBO J.

Sarosiek, K.A., Chi, X., Bachman, J.A., Sims, J.J., Montero, J., Patel, L., Flanagan, A., Andrews, D.W., Sorger, P., and Letai, A. (2013). BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response. Mol. Cell *51*, 751–765.

Satsoura, D., Kučerka, N., Shivakumar, S., Pencer, J., Griffiths, C., Leber, B., Andrews, D.W., Katsaras, J., and Fradin, C. (2012). Interaction of the full-length Bax protein with biomimetic mitochondrial liposomes: A small-angle neutron scattering and fluorescence study. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. *1818*, 384–401.

Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., et al. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. Science *275*, 983–986.

Scatena, C.D., Stewart, Z.A., Mays, D., Tang, L.J., Keefer, C.J., Leach, S.D., and Pietenpol, J.A. (1998). Mitotic Phosphorylation of Bcl-2 during Normal Cell Cycle Progression and Taxol-induced Growth Arrest. J. Biol. Chem. *273*, 30777–30784.

Schenk, R.L., Tuzlak, S., Carrington, E.M., Zhan, Y., Heinzel, S., Teh, C.E., Gray, D.H., Tai, L., Lew, A.M., Villunger, A., et al. (2017). Characterisation of mice lacking all functional isoforms of the pro-survival BCL-2 family member A1 reveals minor defects in the haematopoietic compartment. Cell Death Differ.

Schimmer, A.D., Raza, A., Carter, T.H., Claxton, D., Erba, H., DeAngelo, D.J., Tallman, M.S., Goard, C., and Borthakur, G. (2014). A multicenter phase I/II study of obatoclax mesylate administered as a 3- or 24-hour infusion in older patients with previously untreated acute myeloid leukemia. PloS One *9*, e108694.

Schlesinger, P.H., Gross, A., Yin, X.M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G., and Korsmeyer, S.J. (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 11357–11362.

Schmitt, E., Beauchemin, M., and Bertrand, R. (2007). Nuclear colocalization and interaction between bcl-xL and cdk1(cdc2) during G2/M cell-cycle checkpoint. Oncogene *26*, 5851–5865.

Schulman, J.J., Wright, F.A., Kaufmann, T., and Wojcikiewicz, R.J.H. (2013). The Bcl-2 protein family member Bok binds to the coupling domain of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and protects them from proteolytic cleavage. J. Biol. Chem. *288*, 25340–25349.

Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca2+: a control point for apoptosis. Science *300*, 135–139.

Shih, W., and Yamada, S. (2012). N-cadherin-mediated cell–cell adhesion promotes cell migration in a three-dimensional matrix. J Cell Sci *125*, 3661–3670.

Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. Nature *399*, 483–487.

Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T., and Tsujimoto, Y. (2000). BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 3100–3105.

Shoshan-Barmatz, V., Ben-Hail, D., Admoni, L., Krelin, Y., and Tripathi, S.S. (2014). The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 in tumor cells. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.

Sochalska, M., Tuzlak, S., Egle, A., and Villunger, A. (2015). Lessons from gain- and loss-of-function models of pro-survival Bcl2 family proteins: implications for targeted therapy. FEBS J. *282*, 834–849.

Somlyo, A.P., and Somlyo, A.V. (2003). Ca2+ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. Physiol. Rev. *83*, 1325–1358.

Souers, A.J., Leverson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., et al. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. Nat. Med. *19*, 202–208.

Stein, M.N., Hussain, M., Stadler, W.M., Liu, G., Tereshchenko, I.V., Goodin, S., Jeyamohan, C., Kaufman, H.L., Mehnert, J., and DiPaola, R.S. (2016). A Phase II Study of AT-101 to Overcome Bcl-2--Mediated Resistance to Androgen Deprivation Therapy in Patients With Newly Diagnosed Castration-Sensitive Metastatic Prostate Cancer. Clin. Genitourin. Cancer *14*, 22–27.

Strasser, A., Harris, A.W., Bath, M.L., and Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. Nature *348*, 331–333.

Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J., and Schulz, I. (1983). Release of Ca2+ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. Nature *306*, 67–69.

Subburaj, Y., Cosentino, K., Axmann, M., Pedrueza-Villalmanzo, E., Hermann, E., Bleicken, S., Spatz, J., and García-Sáez, A.J. (2015). Bax monomers form dimer units in the membrane that further self-assemble into multiple oligomeric species. Nat. Commun. *6*, 8042.

Sung, P.J., Tsai, F.D., Vais, H., Court, H., Yang, J., Fehrenbacher, N., Foskett, J.K., and Philips, M.R. (2013). Phosphorylated K-Ras limits cell survival by blocking Bcl-xL sensitization of inositol trisphosphate receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 20593–20598.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., et al. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature *397*, 441–446.

Suzuki, J., Kanemaru, K., Ishii, K., Ohkura, M., Okubo, Y., and Iino, M. (2014). Imaging intraorganellar Ca2+ at subcellular resolution using CEPIA. Nat. Commun. *5*, 4153.

Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. Mol. Cell *8*, 613–621.

Swanson, P.J., Kuslak, S.L., Fang, W., Tze, L., Gaffney, P., Selby, S., Hippen, K.L., Nunez, G., Sidman, C.L., and Behrens, T.W. (2004). Fatal acute lymphoblastic leukemia in mice transgenic for B cell-restricted bcl-xL and c-myc. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *172*, 6684–6691.

Szász, A.M., Lánczky, A., Nagy, Á., Förster, S., Hark, K., Green, J.E., Boussioutas, A., Busuttil, R., Szabó, A., and Győrffy, B. (2016). Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1,065 patients. Oncotarget *7*, 49322–49333.

Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2013). Mitochondrial regulation of cell death. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *5*.

Teng, Y., Xie, X., Walker, S., White, D.T., Mumm, J.S., and Cowell, J.K. (2013). Evaluating human cancer cell metastasis in zebrafish. BMC Cancer *13*, 453.

Territo, P.R., Mootha, V.K., French, S.A., and Balaban, R.S. (2000). Ca(2+) activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *278*, C423-435.

Todt, F., Cakir, Z., Reichenbach, F., Youle, R.J., and Edlich, F. (2013). The C-terminal helix of Bcl-x(L) mediates Bax retrotranslocation from the mitochondria. Cell Death Differ. *20*, 333–342.

Todt, F., Cakir, Z., Reichenbach, F., Emschermann, F., Lauterwasser, J., Kaiser, A., Ichim, G., Tait, S.W.G., Frank, S., Langer, H.F., et al. (2015). Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak. EMBO J. *34*, 67–80.

Tong, J., Wang, P., Tan, S., Chen, D., Nikolovska-Coleska, Z., Zou, F., Yu, J., and Zhang, L. (2017). Mcl-1 degradation is required for targeted therapeutics to eradicate colon cancer cells. Cancer Res.

Tremblais, K., Oliver, L., Juin, P., Le Cabellec, T.M., Meflah, K., and Vallette, F.M. (1999). The C-terminus of bax is not a membrane addressing/anchoring signal. Biochem. Biophys. Res. Commun. *260*, 582–591.

Tsai, F.-C., and Meyer, T. (2012). Ca2+ Pulses Control Local Cycles of Lamellipodia Retraction and Adhesion along the Front of Migrating Cells. Curr. Biol. *22*, 837–842.

Tsai, F.-C., Seki, A., Yang, H.W., Hayer, A., Carrasco, S., Malmersjö, S., and Meyer, T. (2014). A polarized Ca2+, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration. Nat. Cell Biol. *16*, 133–144.

Tsai, F.-C., Kuo, G.-H., Chang, S.-W., and Tsai, P.-J. (2015). Ca2+ signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration, and cancer metastasis. BioMed Res. Int. *2015*, 409245.

Tse, C., Shoemaker, A.R., Adickes, J., Anderson, M.G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E.F., Marsh, K.C., Mitten, M.J., Nimmer, P., et al. (2008). ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. Cancer Res. *68*, 3421–3428.

Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. Science *228*, 1440–1443.

Tsujimoto, Y., Ikegaki, N., and Croce, C.M. (1987). Characterization of the protein product of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. Oncogene *2*, 3–7.

Uchida, K., Miyauchi, H., Furuichi, T., Michikawa, T., and Mikoshiba, K. (2003). Critical regions for activation gating of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. J. Biol. Chem. *278*, 16551–16560.

Um, H.-D. (2016). Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. Oncotarget *7*, 5193–5203.

Valentijn, A.J., Upton, J.-P., Bates, N., and Gilmore, A.P. (2008). Bax targeting to mitochondria occurs via both tail anchor-dependent and -independent mechanisms. Cell Death Differ. *15*, 1243–1254.

Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Schumacker, P.T., and Thompson, C.B. (1999). Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. Mol. Cell *3*, 159–167.

Vander Heiden, M.G., Li, X.X., Gottleib, E., Hill, R.B., Thompson, C.B., and Colombini, M. (2001). Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. J. Biol. Chem. *276*, 19414–19419.

Varadarajan, S., Vogler, M., Butterworth, M., Dinsdale, D., Walensky, L.D., and Cohen, G.M. (2013). Evaluation and critical assessment of putative MCL-1 inhibitors. Cell Death Differ. *20*, 1475–1484.

Vaux, D.L., Cory, S., and Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. Nature *335*, 440–442.

Vaux, D.L., Weissman, I.L., and Kim, S.K. (1992). Prevention of programmed cell death in Caenorhabditis elegans by human bcl-2. Science *258*, 1955–1957.

Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. Cell *75*, 229–240.

Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. Cell *102*, 43–53.

Vervliet, T., Decrock, E., Molgó, J., Sorrentino, V., Missiaen, L., Leybaert, L., De Smedt, H., Kasri, N.N., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2014). Bcl-2 binds to and inhibits ryanodine receptors. J. Cell Sci. *127*, 2782–2792.

Vervliet, T., Lemmens, I., Vandermarliere, E., Decrock, E., Ivanova, H., Monaco, G., Sorrentino, V., Kasri, N.N., Missiaen, L., Martens, L., et al. (2015). Ryanodine receptors are targeted by anti-apoptotic Bcl-XL involving its BH4 domain and Lys87 from its BH3 domain. Sci. Rep. *5*, 9641.

Vervliet, T., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2016). Bcl-2 proteins and calcium signaling: complexity beneath the surface. Oncogene.

Vinzenz, M., Nemethova, M., Schur, F., Mueller, J., Narita, A., Urban, E., Winkler, C., Schmeiser, C., Koestler, S.A., Rottner, K., et al. (2012). Actin branching in the initiation and maintenance of lamellipodia. J Cell Sci *125*, 2775–2785.

Wagner, K.U., Claudio, E., Rucker, E.B., Riedlinger, G., Broussard, C., Schwartzberg, P.L., Siebenlist, U., and Hennighausen, L. (2000). Conditional deletion of the Bcl-x gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly. Development *127*, 4949–4958.

Walton, K.D., Wagner, K.U., Rucker, E.B., Shillingford, J.M., Miyoshi, K., and Hennighausen, L. (2001). Conditional deletion of the bcl-x gene from mouse mammary epithelium results in accelerated apoptosis during involution but does not compromise cell function during lactation. Mech. Dev. *109*, 281–293.

Wang, J., Beauchemin, M., and Bertrand, R. (2011). Bcl-xL phosphorylation at Ser49 by polo kinase 3 during cell cycle progression and checkpoints. Cell. Signal. *23*, 2030–2038.

Wang, J., Beauchemin, M., and Bertrand, R. (2014). Phospho-Bcl-xL(Ser62) influences spindle assembly and chromosome segregation during mitosis. Cell Cycle Georget. Tex *13*, 1313–1326.

Wang, N.S., Unkila, M.T., Reineks, E.Z., and Distelhorst, C.W. (2001). Transient expression of wild-type or mitochondrially targeted Bcl-2 induces apoptosis, whereas transient expression of endoplasmic reticulum-targeted Bcl-2 is protective against Bax-induced cell death. J. Biol. Chem. *276*, 44117–44128.

Watanabe, J., Kushihata, F., Honda, K., Mominoki, K., Matsuda, S., and Kobayashi, N. (2002). Bcl-xL overexpression in human hepatocellular carcinoma. Int. J. Oncol. *21*, 515–519.

Wei, C., Wang, X., Chen, M., Ouyang, K., Song, L.-S., and Cheng, H. (2009). Calcium Flickers Steer Cell Migration. Nature *457*, 901–905.

Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. Science *292*, 727–730.

Weiler, M., Bähr, O., Hohlweg, U., Naumann, U., Rieger, J., Huang, H., Tabatabai, G., Krell, H.W., Ohgaki, H., Weller, M., et al. (2006). BCL-xL: time-dependent dissociation between modulation of apoptosis and invasiveness in human malignant glioma cells. Cell Death Differ. *13*, 1156–1169.

Wells, J.A., and McClendon, C.L. (2007). Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. Nature *450*, 1001–1009.

Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., and Kluck, R.M. (2011). Molecular biology of Bax and Bak activation and action. Biochim. Biophys. Acta *1813*, 521–531.

White, C., Li, C., Yang, J., Petrenko, N.B., Madesh, M., Thompson, C.B., and Foskett, J.K. (2005). The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R. Nat. Cell Biol. *7*, 1021–1028.

Wick, W., Wagner, S., Kerkau, S., Dichgans, J., Tonn, J.C., and Weller, M. (1998). BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. FEBS Lett. *440*, 419–424.

Williams, A., Hayashi, T., Wolozny, D., Yin, B., Su, T.-C., Betenbaugh, M.J., and Su, T.-P. (2016). The non-apoptotic action of Bcl-xL: regulating Ca(2+) signaling and bioenergetics at the ER-mitochondrion interface. J. Bioenerg. Biomembr. *48*, 211–225.

Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. Genes Dev. *19*, 1294–1305.

Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., Delft, M.F. van, Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., et al. (2007). Apoptosis Initiated When BH3 Ligands Engage Multiple Bcl-2 Homologs, Not Bax or Bak. Science *315*, 856–859.

Xu, C., Xu, W., Palmer, A.E., and Reed, J.C. (2008). BI-1 Regulates Endoplasmic Reticulum Ca2+ Homeostasis Downstream of Bcl-2 Family Proteins. J. Biol. Chem. *283*, 11477–11484.

Yang, J., Vais, H., Gu, W., and Foskett, J.K. (2016). Biphasic regulation of InsP3 receptor gating by dual Ca2+ release channel BH3-like domains mediates Bcl-xL control of cell viability. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.

Yang, S., Zhang, J.J., and Huang, X.-Y. (2009). Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. Cancer Cell *15*, 124–134.

Yi, C.H., Pan, H., Seebacher, J., Jang, I.-H., Hyberts, S.G., Heffron, G.J., Vander Heiden, M.G., Yang, R., Li, F., Locasale, J.W., et al. (2011). Metabolic regulation of protein N-alpha-acetylation by Bcl-xL promotes cell survival. Cell *146*, 607–620.

Yin, X.M., Oltvai, Z.N., and Korsmeyer, S.J. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. Nature *369*, 321–323.

Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., and Korsmeyer, S.J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. Nature *400*, 886–891.

Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 47–59.

Young, A.I.J., Law, A.M.K., Castillo, L., Chong, S., Cullen, H.D., Koehler, M., Herzog, S., Brummer, T., Lee, E.F., Fairlie, W.D., et al. (2016). MCL-1 inhibition provides a new way to suppress breast cancer metastasis and increase sensitivity to dasatinib. Breast Cancer Res. BCR *18*, 125.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). Cell *87*, 619–628.

Zhao, J., Zhang, J., Yu, M., Xie, Y., Huang, Y., Wolff, D.W., Abel, P.W., and Tu, Y. (2013). Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. Oncogene *32*, 4814–4824.

Zhong, F., Harr, M.W., Bultynck, G., Monaco, G., Parys, J.B., De Smedt, H., Rong, Y.-P., Molitoris, J.K., Lam, M., Ryder, C., et al. (2011). Induction of Ca^2+-driven apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells by peptide-mediated disruption of Bcl-2-IP3 receptor interaction. Blood *117*, 2924–2934.

Zhou, M., Li, Y., Hu, Q., Bai, X.-C., Huang, W., Yan, C., Scheres, S.H.W., and Shi, Y. (2015). Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome c- and dATP-mediated activation of Apaf-1. Genes Dev. *29*, 2349–2361.

Zhu, L., Yu, Y., Chua, B.H.L., Ho, Y.-S., and Kuo, T.H. (2001). Regulation of Sodium–Calcium Exchange and Mitochondrial Energetics by Bcl-2 in the Heart of Transgenic Mice. J. Mol. Cell. Cardiol. *33*, 2135–2144.

Zhu, Y., Swanson, B.J., Wang, M., Hildeman, D.A., Schaefer, B.C., Liu, X., Suzuki, H., Mihara, K., Kappler, J., and Marrack, P. (2004). Constitutive association of the proapoptotic protein Bim with Bcl-2-related proteins on mitochondria in T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 7681–7686.

Zuo, J., Ishikawa, T., Boutros, S., Xiao, Z., Humtsoe, J.O., and Kramer, R.H. (2010). Bcl-2 overexpression induces a partial epithelial to mesenchymal transition and promotes squamous carcinoma cell invasion and metastasis. Mol. Cancer Res. MCR *8*, 170–182.

Résumé

Les protéines de la famille Bcl-2 sont les principaux régulateurs de la mort cellulaire par apoptose. Au sein de cette famille, la protéine Bcl-xL appartient au sous-groupe des anti-apoptotiques et contribue à maintenir la survie cellulaire. Cependant, des données récentes suggèrent que les membres de la famille Bcl-2, et en particulier Bcl-xL, ont également d'autres fonctions.
Dans le contexte pathologique du cancer du sein, la surexpression du gène *Bcl-x* n'affecterait pas la taille de la tumeur initiale mais favoriserait plutôt l'invasion ganglionnaire et la formation de métastases. La capacité des tumeurs à former des métastases repose notamment sur le potentiel migratoire et invasif des cellules cancéreuses, et de ce fait nous avons cherché à savoir si Bcl-xL pouvait contrôler ces processus. En lien avec les données cliniques, nous montrons que la perte d'expression de Bcl-xL réduit la capacité migratoire de cellules cancéreuses mammaires. De plus, le contrôle de la migration exercé par Bcl-xL est indépendant de son activité anti-apoptotique. Ainsi, l'inhibition de la poche hydrophobe de Bcl-xL par des composés BH3-mimétiques n'a pas d'effet sur la migration des cellules. Nous avons alors recherché le mécanisme par lequel Bcl-xL agit sur la migration. Nous observons que la fraction mitochondriale de Bcl-xL régule la migration cellulaire, et non la protéine localisée au réticulum endoplasmique. Au niveau de la mitochondrie, nous proposons que Bcl-xL contrôle la migration par l'intermédiaire de son domaine BH4, domaine modulant l'activité du canal mitochondrial VDAC.

Abstract

Proteins of the Bcl-2 family are the main regulators of apoptosis. Among the family, the Bcl-xL protein belongs to the anti-apoptotic subgroup and favors cell survival. However, increasing evidence suggest that Bcl-2 proteins, and in particular Bcl-xL, exert other functions in the cells.
In the pathological context of breast cancer, *Bcl-x* gene overexpression seems to have only little impact on primary tumor growth but instead increases lymph nodes invasion and metastasis. Metastasis formation mainly relies on tumor cells' ability to migrate and invade surrounding tissues. Therefore, we wondered wether Bcl-xL could control these processes.
In line with clinical data, we show that Bcl-xL complete or partial loss of expression reduces cell migration of mammary cancer cell lines. Furthermore, we find that Bcl-xL control of cell migration is independent of its anti-apoptotic activity. Indeed, treatments with BH3-mimetics that bind to and inhibit Bcl-xL hydrophobic pocket have no effect on cell migration. Since Bcl-xL regulation of cell migration seems to be independent of interactions with other Bcl-2 family members, we investigated alternative mechanisms. We observe that mitochondrial Bcl-xL, but not the ER-targeted Bcl-xL, is involved in cell migration. At the mitochondria, we propose that Bcl-xL controls cell migration through its BH4 domain, by modulating the activity of mitochondrial VDAC channel.

Mots clés

Protéines Bcl-2 – Migration – Mitochondrie – Cancer – Calcium – Bcl-xL