

APOPTOSE : PERSPECTIVES ET PROMESSES

Pierre May

L'apoptose est un processus normal se produisant durant le développement et dans divers tissus de l'organisme adulte [1, 2]. En outre, il est de plus en plus clair que les mécanismes responsables de l'apoptose sont impliqués dans de nombreux aspects de maladies humaines. D'une part, les manifestations cliniques d'un grand nombre de désordres sont la conséquence d'une stimulation anormale de l'apoptose ; c'est le cas, notamment, dans la maladie d'Alzheimer, la maladie de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique, l'infarctus du myocarde et le syndrome d'immunodéficience acquise. D'autre part, une inactivation de l'apoptose peut aboutir à une augmentation du nombre de cellules et, en conséquence, à une prolifération incontrôlée. Il est très vraisemblable que certaines tumeurs malignes soient, en fait, la conséquence de facteurs qui suppriment l'apoptose [3].

Le concept relativement récent d'apoptose a offert une vision nouvelle du comportement des cellules vivantes qui permet de concevoir des stratégies novatrices pour le traitement et la prévention de maladies. Ces dernières années ont vu une véritable explosion dans le nombre d'articles publiés sur l'apoptose. Dès à présent, il est bien établi que le sort des cellules des mammifères dépend très étroitement de l'action de certaines protéines conditionnant la survie cellulaire. Au nombre de celles-ci s'inscrivent p53 (*m/s n° 12, vol. 12,*

p. 1461) [4-7], la famille Bcl-2 (*m/s n° 5, vol. 13, p. 738*) [8-10] et la famille des caspases (*m/s n° 12, vol. 11, p. 1758*) [10-12, 16].

De façon particulièrement opportune, *médecine/sciences* offre à ses lecteurs une série d'articles consacrés à des aspects d'importance considérable dans ce domaine. B. Mignotte *et al.* (*p. 54 de ce numéro*) révèlent que des événements affectant les mitochondries représentent une étape précoce impliquée obligatoirement dans le déroulement du processus d'apoptose [13]. Avant même que les cellules présentent les manifestations classiques de l'apoptose nucléaire, elles subissent une diminution du potentiel transmembranaire de la mitochondrie (DYm) qui peut être associée à l'ouverture de mégapores (*permeability transition pores*). Cette dissipation de DYm est détectable quel que soit l'inducteur de l'apoptose, physiologique ou non.

Les mitochondries qui subissent la transition de perméabilité libéreraient des activateurs de protéases capables de déclencher les manifestations nucléaires de l'apoptose. Les auteurs ont établi que, notamment, une protéase apoptogène (AIF pour *apoptosis inducing factor*) était libérée. En fait, la transition peut être inhibée par Bcl-2 (*m/s n° 5, vol. 13, p. 738*) qui est présent sur la membrane extérieure de la mitochondrie près des sites de contact membrane externe/membrane interne où les mégapores sont supposés se former. Par ailleurs, le cytochrome c, en se dissociant des mitochondries au

ADRESSE

P. May : directeur de recherche émérite au Cnrs. Laboratoire de cancérogenèse moléculaire - DRR, DSV, CEA de Fontenay-aux-Roses, BP n° 6, 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex, France.

cours de l'apoptose, activerait des protéases impliquées dans les manifestations nucléaires de l'apoptose. Admettant que les mitochondries sont des endosymbiontes ayant pour origine une bactérie aérobie qui aurait été absorbée par l'ancêtre des cellules eucaryotes, les auteurs suggèrent qu'une partie de la machinerie cellulaire apoptotique existerait chez des organismes unicellulaires et que les métabolites auraient exploité cette possibilité en connectant les effecteurs mitochondriaux de la mort cellulaire aux voies de transmission de signaux.

Cependant les deux types de processus mortel, apoptose (mort cellulaire programmée) et nécrose (mort cellulaire accidentelle) peuvent se produire simultanément dans des tissus ou des cultures de cellules exposés à un même stimulus. Souvent l'intensité du stimulus initial détermine le choix entre les deux processus mortels (apoptose/nécrose). De ce fait, tandis que des événements précoces peuvent être communs aux deux types de mort cellulaire, un système de contrôle doit être nécessaire pour engager la cellule dans l'une ou l'autre voie. B.S. Polla *et al.* (p. 18 de ce numéro), confirmant le retour sur la scène des mitochondries, suggèrent que le choix cellulaire entre les deux types de mort cellulaire se ferait au niveau mitochondrial. En outre, ces auteurs révèlent que des protéines de choc thermique (*heat shock proteins*), HSP et plus spécialement des Hsp70 et Hsp27 jouent un rôle régulateur dans la décision – mort ou survie cellulaire [14]. L'inhibition de l'apoptose est étroitement liée à l'induction de la thermotolérance et aux niveaux d'expression des HSP. Cette prévention de l'apoptose par les HSP semble s'exercer essentiellement par l'intermédiaire d'une protection contre les oxydants. *In vivo*, de nombreux modèles expérimentaux d'ischémie-reperfusion ont établi l'effet protecteur de la préexposition à un choc thermique associé à la sur-expression d'Hsp70 dans l'organe considéré. Plus récemment, Hsp27 s'est avéré jouer un rôle de protection similaire à celui de Hsp70 contre les métabolites réactifs de l'oxygène, la cytotoxicité du TNF α , et contre

l'apoptose induite par le ligand Fas/APO-1 ou la staurosporine.

Sur la base de ces résultats, les auteurs suggèrent que la mitochondrie pourrait être le carrefour décisionnel entre nécrose et apoptose, sous le contrôle d'une sentinelle essentielle l'Hsp70. Aussi bien les Hsp70 que les mitochondries joueraient de ce fait un rôle déterminant dans les processus inflammatoires, dans la mesure où le type de mort cellulaire en détermine l'évolution (l'inflammation est amplifiée par la nécrose, elle est limitée par l'apoptose). Dans ce contexte l'asthme apparaîtrait comme un exemple de réaction inflammatoire dans laquelle une inhibition de l'apoptose pourrait être associée à une chronicité de l'inflammation.

Les études génétiques chez le nématode hermaphrodite *Caenorhabditis elegans* [15] ont apporté un argument décisif en faveur d'un rôle de la protéolyse dans le processus d'apoptose. A côté des 959 cellules qui sont engendrées et présentes chez l'adulte, 131 cellules ne sont engendrées que pour subir une mort cellulaire programmée. Les cellules destinées à vivre et celles qui sont destinées à mourir constituent une caractéristique invariante du développement de *C. elegans*. Au point de vue du mécanisme, ces morts programmées génétiquement sont très similaires au processus d'apoptose observé dans de nombreux types cellulaires à la suite d'une grande diversité de stimulus. Les gènes qui sont impliqués dans la mort programmée chez *C. elegans* ont été identifiés. Deux gènes *ced-3* et *ced-4* s'avèrent absolument essentiels pour le processus de mort cellulaire (*m/s n° 11, vol. 13, p. 1142*) [16]. La protéine Ced-3 présente une analogie très significative avec ICE, une protéase à cystéine qui clive la protéine inactive interleukine-1 β de 31 kDa pour engendrer la cytokine active de 17,5 kDa. La plus longue séquence conservée entre Ced-3 et ICE (QACRG*) contient une cystéine indispensable à l'activité de ICE. ICE est une protéase nécessitant

impérativement un résidu aspartique au site de clivage.

ICE est le prototype d'une famille de protéases à cystéine identifiées récemment et prenant rapidement une très grande extension (*m/s n° 12, vol. 11, p. 1758*). A ce jour, une dizaine d'homologues d'origine humaine de ICE ont été déjà identifiés. Ces protéases ont été regroupées sous le nom générique de caspases. « c » pour refléter le mécanisme de protéase à cystéine et « aspase » pour rappeler leur capacité de cliver après un acide aspartique [16]. Alexandre Mignon *et al.* (p. 9 de ce numéro) présentent une analyse du rôle des caspases dans le processus d'apoptose en soulignant les importantes implications thérapeutiques que l'on peut en attendre. Cet article replace le rôle des caspases dans le contexte du processus apoptotique impliquant les interactions entre la famille Bcl-2 et les caspases, ainsi que le rôle des mitochondries. Diverses observations suggèrent un rôle de ICE dans certains types d'apoptose mais il a été montré que d'autres caspases sont impliquées dans la réponse apoptotique à divers stimulus. Le produit du gène *CrmA* du virus de la vaccine et la protéine p35 du baculovirus interfèrent tous les deux avec les caspases et inhibent l'apoptose. Cette observation confirme que les caspases sont impliquées dans le processus apoptotique et leurs inhibiteurs ont été utilisés pour définir le rôle individuel des protéases dans l'apoptose. Les membres de la famille des caspases clivent les substrats à un résidu acide aspartique en position P1 par rapport à un site de clivage térapeptidique. Cependant, certaines caspases ont des spécificités différentes qui sont en corrélation avec le résidu en position P4 du site de clivage consensus. Ces deux caractéristiques ont été mises à profit pour synthétiser des inhibiteurs ayant une spécificité ou une cinétique d'inhibition différente pour différentes caspases. Des inhibiteurs intracellulaires de caspases peuvent jouer un rôle important dans la régulation de l'apoptose. Quoique le rôle des diverses caspases dans l'apoptose induite par divers stimulus dans différents types de cellules ne soit pas complètement clarifié, plu-

* Gln-Ala-Cys-Arg-Gly.

sieurs caractéristiques communes de ces enzymes ont été mises en lumière. Toutes les caspases sous leur forme active se présentent comme des multimères (probablement tétramères $a_2 b_2$) composés de sous-unités grandes (17-22 kDa) et petites (10-12 kDa). Dans ce cas les unités (grandes et petites) sont codées par un seul transcrite qui est traduit en pro-enzyme subissant ensuite un clivage à des liaisons Asp-X pour produire les deux sous-unités.

La question se pose de savoir quels sont les peptides affectés par l'activité protéolytique des caspases. Quelques cibles des caspases ont été identifiées jusqu'à présent : le polypeptide 70 kDa des particules U1 de ribonucléoprotéines, la pro-IL- β , les lamines nucléaires, la topo-isomérase I, la PARP (poly (ADP-ribose) polymérase), une protéine kinase dépendante de l'ADN, la protéine kinase C- δ , etc. Toutes les caspases ont des sites catalytiques voisins et ces enzymes présentent la propriété de s'auto-activer ou d'activer d'autres caspases. Ces particularités suggèrent l'existence d'un fonctionnement en cascade des caspases aboutissant au développement des changements apoptotiques dans le noyau cellulaire. De multiples membres de la famille des caspases pourraient participer au processus d'apoptose déclenché par différents stimulus dans divers types cellulaires. Chacun des trois articles présentés dans ce numéro apporte une précieuse contribution à la connaissance

de divers aspects majeurs de l'apoptose. Les connaissances acquises suggèrent que le dérèglement de l'apoptose joue un rôle dans la pathogénie d'une grande diversité de maladies humaines ; elles ouvrent la voie à la recherche d'inhibiteurs pour traiter des maladies dégénératives, inflammatoires, virales et vasculaires. A l'inverse, la recherche d'une activation sélective de l'apoptose pourrait conduire à une amélioration sensible du traitement du cancer ■

RÉFÉRENCES

- White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 1996 ; 10 : 1-15.
- Martins LM, and Earnshaw WC. Apoptosis : alive and kicking in 1997. *Cell Biol* 1997 ; 7 : 111-4.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995 ; 267 : 1456-62.
- Bates S, Vousden KH. p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1996 ; 6 : 12-9.
- Yonish-Rouach E, Choisy C, Deguin V, Breugnot C, May E. The role of p53 as a transcription factor in the induction of apoptosis. *Behring Inst Mitt* 1996 ; 97 : 60-71.
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997 ; 88 : 323-31.
- Choisy-Rossi C, Yonish-Rouach E. Apoptosis and the cell cycle : the p53 connection. *Cell Death Differ* 1998 ; 4 (sous presse).
- Rao L, White E. Bcl-2 and the ICE family of apoptotic regulators : making a connection. *Curr Opin Genet Dev* 1997 ; 7 : 52-8.
- Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, Israels S, Roncinske R, et al. Role for bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 6939-42.
- Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997 ; 3 : 614-20.
- Patel T, Gores GJ, Kaufman SH. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J*. 1996 ; 10 : 587-97.
- Villa P, Kaufman SH, Earnshaw WC. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Bio Sci* 1997 ; 22 : 388-93.
- Mignotte B, Zamzami N, Petit PX, Vaysière JL, Kroemer G. Contrôle mitochondrial de l'apoptose : la mort cellulaire programmée est-elle apparue à la suite de l'événement endosymbiotique à l'origine des mitochondries ? *Med Sci* 1998 ; 14 : 54-60.
- Polla BS, Banzet N, Dall'Ava J, Arrigo AP, Vignola AM. Les mitochondries, carrefour entre vie et mort cellulaire : rôles des HSP et conséquences sur l'inflammation. *Med Sci* 1998 ; 14 : 18-25.
- Labouesse M. *C. elegans*, les promesses d'un petit animal intelligent : « small is beautiful ». *Med Sci* 1994 ; 10 : 337-41.
- Mignon A, Rouquet N, Joulin V. Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose : un enjeu thérapeutique pour demain ? *Med Sci* 1998 ; 14 : 9-17.

TIRÉS À PART

P. May.

6^e Symposium de Génétique Humaine
Paris, France