

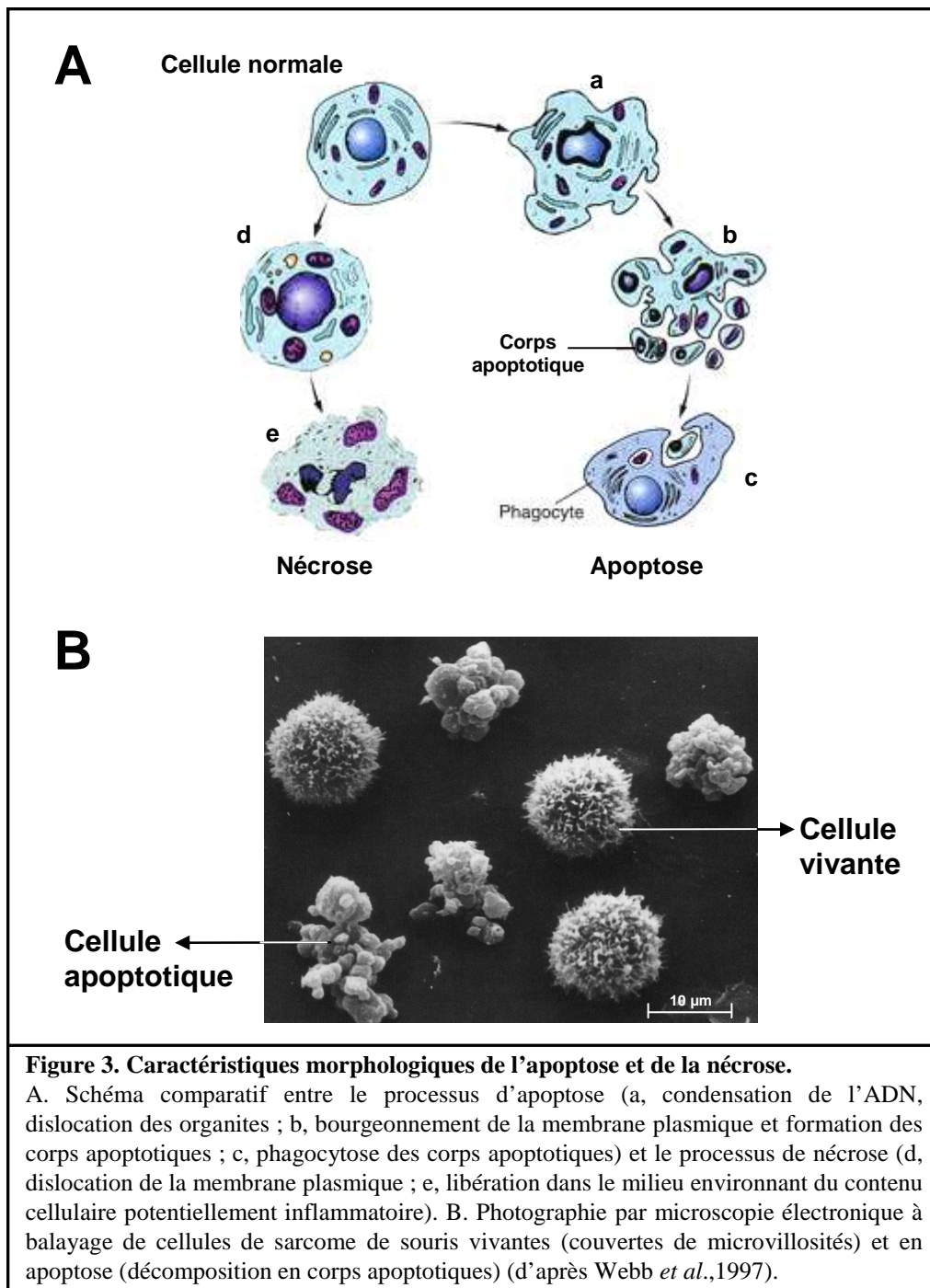
## Chapitre II - L'apoptose

Le développement harmonieux et la survie de tout organisme multicellulaire résultent d'un contrôle précis du nombre de cellules qui le composent grâce à un équilibre entre les phénomènes de prolifération et de mort cellulaire. Toutes les cellules ont la capacité de se détruire en activant un programme intrinsèque dont l'exécution aboutit à une forme de mort cellulaire, l'apoptose (Kerr *et al.*, 1972). L'apoptose est un processus physiologique par lequel des cellules surnuméraires ou dysfonctionnelles sont éliminées de l'organisme. L'apoptose joue notamment un rôle déterminant dans l'embryogenèse (par exemple, l'individualisation des doigts), dans certains changements morphologiques (par exemple, la régression de la queue du têtard et la métamorphose de certains insectes), dans l'homéostasie cellulaire, dans l'atrophie (par exemple, les menstruations), dans le fonctionnement et l'homéostasie du système immunitaire (par exemple, l'apprentissage du soi par les lymphocytes), dans la réparation des tissus et dans la régression des tumeurs.

Cependant, le dérèglement pathologique du processus d'apoptose ou de son contrôle est à l'origine de nombreuses maladies comme les cancers, certains désordres immuns, les maladies neuro-dégénératives (Alzheimer, Parkinson), les maladies cardio-vasculaires (infarctus), le sida (caractérisé par la disparition des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>). Plusieurs études suggèrent qu'un dérèglement du processus apoptotique est également à la base de maladies inflammatoires comme l'asthme, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), la maladie de Crohn, l'arthrite rhumatoïde, *etc.*

### II.1. Historique

Le mot apoptose provient d'une locution grecque signifiant "chute des feuilles" et était déjà utilisée par Hippocrate de Kos (460-377 av. J.C.) pour décrire la décomposition post-mortem des corps ("chute des os"). L'intérêt accordé à l'étude du processus de mort cellulaire date de plus d'un siècle. En 1842, le naturaliste Carl Vogt décrit pour la première fois un processus de mort cellulaire en observant la mort des cellules notochordales et cartilagineuses au cours du développement embryonnaire (Vogt, 1842). En 1885, Walter Flemming décrit la fragmentation et la disparition progressive des noyaux et cytoplasmes de cellules épithéliales de follicules ovariens en régression (Flemming, 1885). En 1951, Alfred Glucksmann émet l'hypothèse que cette "mort cellulaire" programmée se produirait à des moments bien précis du développement d'un organisme (Glucksmann, 1951). C'est enfin en 1972 que John Kerr, Andrew Wyllie et Alastair Curie introduisent le mot "apoptose" pour désigner un modèle de mort cellulaire nouvellement observé, en opposition au modèle de la nécrose déjà connu à l'époque. Alors que la nécrose est un phénomène passif faisant suite à une agression extérieure, la mort par apoptose est un processus actif, organisé temporellement, au cours duquel la cellule exprime un ensemble de gènes entraînant des modifications morphologiques, biochimiques et structurales aboutissant à sa destruction "sans traces" et complète (Kerr *et al.*, 1972). Enfin, c'est au cours des 30 dernières années, et grâce notamment aux recherches menées par John Sulston, Sydney Brenner et Robert Horvitz sur le développement du nématode *Caenorhabditis elegans*, que le programme génétique et moléculaire associé au déclenchement et à la transduction du signal apoptotique a été déchiffré. John Sulston, Sydney Brenner et Robert Horvitz ont reçu le prix



Nobel de Médecine et Physiologie en 2002, couronnant l'importance de leurs découvertes (Peter *et al.*, 1997 ; Kerr, 2002 ; Lendahl et Orrenius, 2002 ; Vaux, 2002).

## **II.2. Caractéristiques de l'apoptose**

En dépit de la diversité des signaux de mort, toutes les cellules engagées dans le processus apoptotique montrent des modifications morphologiques et biochimiques similaires, suggérant l'existence d'une phase de dégradation commune à tous les types cellulaires.

### **II.2.1. Les stigmates morphologiques**

Lorsqu'une cellule entre en apoptose, les premiers événements morphologiques observables sont la ségrégation de la chromatine à la périphérie de l'enveloppe nucléaire, la condensation du cytoplasme et la formation d'invaginations des membranes plasmiques et nucléaires, donnant un aspect de bourgeon à la surface membranaire périphérique. L'évolution des invaginations membranaires aboutit à la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques, vésicules membranaires contenant le cytoplasme et les organites dégradés (Kerr *et al.*, 1972). *In vivo*, les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés principalement par les macrophages ou les cellules voisines. Ce processus de phagocytose rapide empêche la libération du cytoplasme de la cellule apoptotique dans le milieu environnant et évite ainsi toute réaction inflammatoire (phase nécrose secondaire). Contrairement à l'apoptose, la nécrose, considérée comme une mort cellulaire non coordonnée, est caractérisée par une modification de la perméabilité membranaire entraînant une dilatation du cytoplasme et des organites ; la cellule se gorge d'eau. Dans le cas d'une nécrose, la chromatine nucléaire flocule et la synthèse protéique diminue. La rupture des membranes conduit à la libération dans le milieu environnant du contenu cytoplasmique, déclenchant une réaction inflammatoire (Allen *et al.*, 1997). La figure 3 modélise les différents changements morphologiques d'une cellule associés aux processus d'apoptose et de nécrose.

### **II.2.2. Les stigmates biochimiques**

De nombreux changements biochimiques sont observés dans les cellules apoptotiques :

- Modification des flux calciques responsables de l'activation de nombreuses enzymes, dont les nucléases qui induisent la fragmentation de l'ADN (Ucker *et al.*, 1992 ; Wu *et al.*, 2000).
- Activation de trans-glutaminases impliquées dans la réorganisation des éléments du cytosquelette menant aux invaginations membranaires et à la formation des corps apoptotiques (Gentile *et al.*, 1992).
- Activation des protéinases cystéine-aspartate dépendantes (caspases).
- Accumulation des céramides.
- Génération de radicaux libres et FRO.
- Perte de l'asymétrie de la membrane plasmique et externalisation de la phosphatidylsérine (PS) depuis le feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane. Ce phénomène d'externalisation et d'exportation de la PS dans la couche externe de la membrane cellulaire apparaît tôt dans l'apoptose et semble indépendant du type cellulaire. Un

changement dans la composition et l'expression des oligosaccharides de surface est également observé à la surface des cellules apoptotiques. Les PS et les oligosaccharides sont reconnus par les récepteurs de la vitronectine et de la fibronectine des macrophages (Savill *et al.*, 1990 ; Fadok *et al.*, 1992).

- clivage inter-nucléosomal de l'ADN en fragments dont la taille est un multiple entier de 180-200 paires de bases donnant ainsi un aspect en échelle sur gel d'agarose (Wyllie, 1980). Parfois l'ADN peut être fragmenté en éléments de plus grande taille (50-300 kpb) notamment dans le cas d'apoptose indépendante des caspases.

### **II.2.3. L'atteinte mitochondriale**

De nombreux auteurs ont mis en évidence l'implication des mitochondries au cours du processus apoptotique. Leur participation dans l'apoptose est associée à une transition de la perméabilité membranaire (MTP; *Membrane transition permeability*) et l'effondrement du potentiel trans-membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), résultant de l'ouverture de mégapores mitochondriaux. Du fait de sa haute concentration en solutés, un gonflement osmotique progressif de la matrice est parfois observé, dont l'aboutissement ultime est la rupture physique de la membrane externe. L'ouverture des pores est décrite comme l'étape d'intégration du signal apoptotique et de non-retour de la cellule vers l'apoptose. La MPT peut en effet être induite directement par de nombreux facteurs apoptotiques tels que le calcium, les FRO, un changement de pH (Crompton, 1999) et Bax, une protéine pro-apoptotique de la famille des Bcl (*B cell lymphoma*)-2 (Marzo *et al.*, 1998b), mais également de façon indirecte par des caspases, des céramides et la protéine p53 (suppresseur de tumeur), capables de moduler l'activité de protéines de la famille des Bcl-2 (voir chapitre II.4.3, p. 21, relatif à la famille des protéines Bcl-2).

Les conséquences de l'ouverture des pores mitochondriaux sont multiples : rupture du métabolisme énergétique, formation de radicaux libres lors du découplage de la chaîne respiratoire, libération de facteurs apoptotiques séquestrés dans la matrice, comme le cytochrome c, des pro-caspases et AIF (*Apoptosis inducing factor*), augmentation de la concentration de  $Ca^{++}$  intracellulaire (Petit *et al.*, 1997 ; Gross *et al.*, 1999). Cette altération des mitochondries se produit avant les changements biochimiques de la membrane plasmique et la fragmentation de l'ADN.

### **II.3. Intégration séquentielle du signal apoptotique**

Au cours des dernières années, les recherches ont porté sur l'identification des éléments du programme de mort cellulaire. Cependant, malgré la découverte d'acteurs importants dans ce processus, peu d'éléments sont encore à notre disposition pour construire une image cohérente de la façon dont le programme apoptotique se déclenche et est régulé. Ceci est dû au fait que beaucoup de facteurs susceptibles d'induire l'apoptose (par exemple les protéines oncogéniques, les protéines suppresseurs de tumeurs, les facteurs de croissance et certaines cytokines) sont aussi capables de l'inhiber dans certains cas. *In fine*, la réponse biologique de la cellule résulte de l'intégration des différentes signalisations de l'environnement qui lui sont perceptibles en fonction de son génotype et de son phénotype à ce moment donné.

Cependant, malgré l'extrême diversité des signaux intervenant dans l'exécution du programme apoptotique et sa régulation, on peut dégager des mécanismes généraux qui se sont conservés au travers de l'évolution et qui font

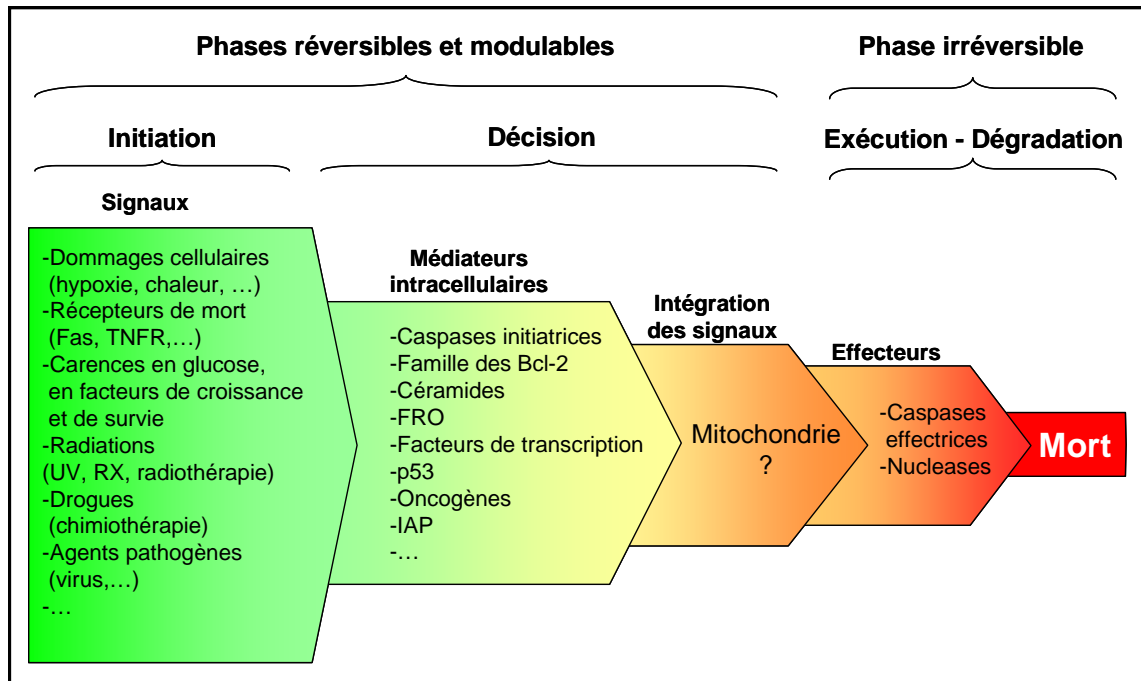


Figure 4. Les phases de l'apoptose - Intégration séquentielle du signal apoptotique.

intervenir des protéines dont l'expression conditionne la survie cellulaire comme par exemple des protéases intracellulaires spécifiques appelées caspases, des cytokines, les protéines de la famille Bcl-2, *etc.*

La figure 4 modélise les différentes étapes intervenant dans l'apoptose, depuis le signal susceptible de déclencher le programme apoptotique jusqu'à la mort cellulaire. Le processus apoptotique peut être divisé en trois phases chronologiques successives. Les deux premières, dites d'initiation et de décision sont toutes les deux réversibles et modulables par des facteurs anti-apoptotiques. La troisième phase, dite d'exécution ou de dégradation protéique et nucléaire est irréversible et confère à la cellule les caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose.

La phase d'initiation de l'apoptose peut être déclenchée par des stimuli aussi variés que des radiations ionisantes (Farrell *et al.*, 1998), une carence en facteurs de croissance (Martinou *et al.*, 1999 ; Tammariello *et al.*, 2000), des drogues cytotoxiques (Bose *et al.*, 1995 ; Boland *et al.*, 1997), du glucose (Kaneto *et al.*, 1996), des acides gras (Paumen *et al.*, 1997 ; Shimabukuro *et al.*, 1998a ; 1998b), des céramides (Obeid *et al.*, 1993) ou des formes réactives de l'oxygène (Goldkorn *et al.*, 1998). Les cytokines membres de la famille du TNF- $\alpha$  ainsi que leurs récepteurs jouent un rôle particulièrement important dans le contrôle de cette phase d'initiation (Pitti *et al.*, 1996). La phase de décision est l'étape au cours de laquelle les différents signaux de mort et/ou de survie sont intégrés par la cellule qui, en fonction de son état physiologique et de son contexte environnemental, va orienter la réponse vers la mort ou la survie. Cette intégration fait appel à un certain nombre de médiateurs intracellulaires anti-ou pro-apoptotiques tels que les caspases, les FRO, les protéines de la famille Bcl-2, la mitochondrie, les céramides, *etc.*

## **II.4. Les principaux médiateurs cellulaires régulateurs de l'apoptose**

### **II.4.1. Les récepteurs membranaires de la famille du TNF- $\alpha$**

Les cytokines membres de la famille du TNF- $\alpha$  ainsi que leurs récepteurs jouent un rôle important dans l'apoptose (Pitti *et al.*, 1996). Seize ligands membres de la famille du TNF ont été identifiés: TNF- $\alpha$ , FasL, les ligands similaires au TNF- $\alpha$  induisant l'apoptose (TRAIL), lymphotoxine  $\alpha$ , lymphotoxine  $\beta$ , CD27L, CD30L, CD40L, CD137L, OX40L, RANKL (*Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand*), LIGHT (*Lymphotoxin-like inducible protein that competes with glycoprotein D for herpesvirus entry mediator on T cells*), TWEAK (*Tumour necrosis factor-like weak inducer of apoptosis*), APRIL (*TNF homolog A proliferation-inducing ligand*), TL1 (*TNF-like-1*) et BAFF (*B cell-activating factor of the TNF family*) (So *et al.*, 2006). La plupart de ces ligands sont synthétisés sous forme de précurseurs trans-membranaires avant que leurs domaines extracellulaires soient clivés par des métalloprotéases. Les ligands sont produits sous une forme trimérique et ont chacun un ou plusieurs spécifiques. Ces récepteurs appartiennent à la famille du récepteur au TNF- $\alpha$ . Ce sont des protéines trans-membranaires caractérisées par un motif extracellulaire riche en résidus cystéines et un domaine intracellulaire contenant un motif peptidique caractéristique dit "domaine de mort" (DD; *Death Domain*). Tous ces ligands n'induisent pas la mort cellulaire. Au contraire, ils peuvent induire des signaux de survie notamment pour certaines cellules de l'immunité. D'autres encore auront un rôle différent sur l'apoptose en fonction du type cellulaire. La mort initiée par ces ligands requiert la trimérisation des récepteurs et conduit à l'activation des caspases cytoplasmiques (Longthorne et Williams, 1997).















Caspases	Autres noms	Site de clivage (séquence peptidique)	Fonction
2	Ich-1, NEDD2	 DEHD	initiateur d'apoptose
9	Mch6, ICE-LAP6	 LEHD	
8	Mch5, FLICE, MACH	 LETD	
10	Mch4, FLICE-2	 LEND	
3	CPP32, Yama, Apopain	 DEVD	effecteur d'apoptose
6	Mch2	 VEHD	
7	Mch3, ICE-LAP3	 DEVD	
1	ICE	 WEHD	maturation de cytokines
4	ICE <sub>rel II</sub> , Tx, Ich-2	 (WL)EHD	
5	ICE <sub>rel III</sub> , Tx, Ty	 (WL)EHD	
11		 WEHD	
12		 WEHD	
13	ERICE	 WEHD	
14	MICE	 WEHD	

Figure 5. Comparaison structurelle des pro-caspases et des spécificités de substrats des caspases humaines (1-10) et murines (11-14) (d'après Strasser, 2000 ; Delhalle, 2002).

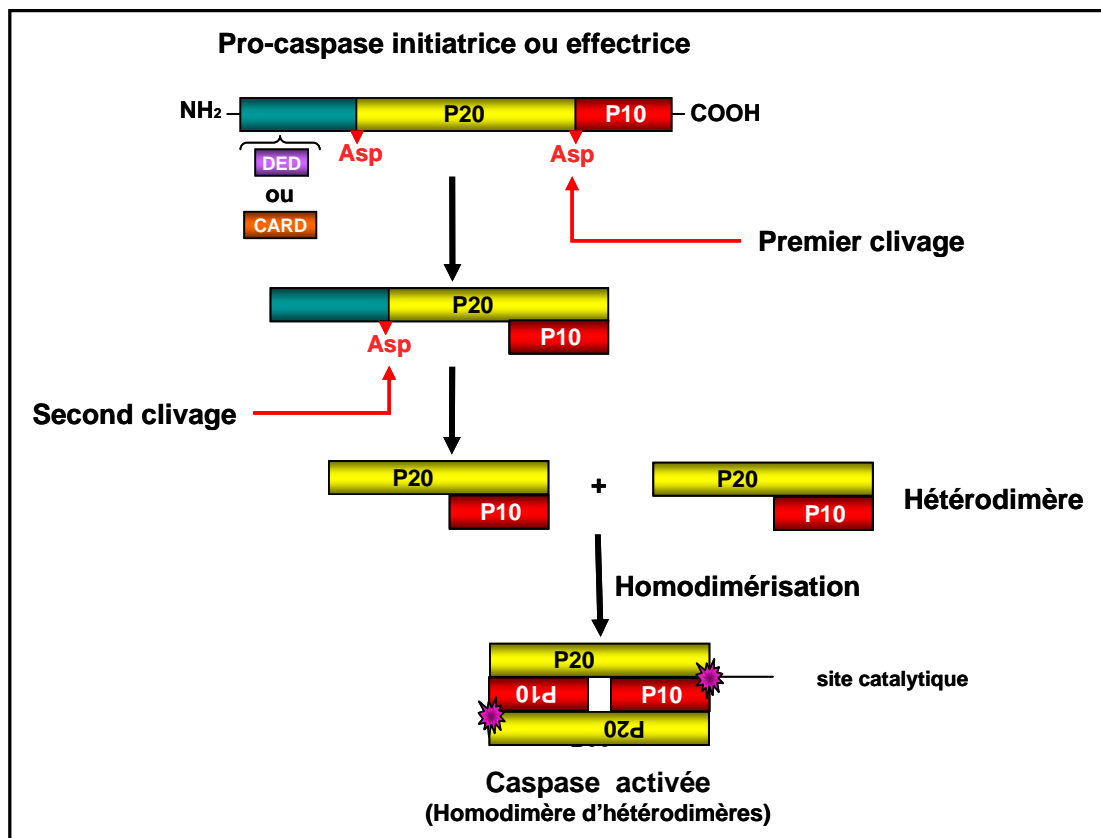


Figure 6. Mécanisme d'activation des caspases.

Les structures des pro-caspases initiatrices et effectrices sont représentées. Les pro-domaines N-terminaux sont représentés en bleu, les grandes sous-unités sont en jaune et les petites sous-unités en rouge. La caspase active résulte de la protéolyse et de l'assemblage de deux précurseurs (d'après Amarante-Mendes et Green, 1999).

## **II.4.2. Les caspases**

La plupart des changements morphologiques et biochimiques observés au cours de l'apoptose résulte de l'activation de protéases intracellulaires spécifiques, les caspases. Les caspases ne sont pas seulement des enzymes de dégradation mais aussi des molécules de signalisation hautement régulées contrôlant des processus biologiques critiques pour la cellule par le biais de protéolyses limitées et spécifiques. Ces protéases présentent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu aspartique. C'est d'ailleurs sur base de cette propriété qu'Alnemri les a dénommées "caspases", pour "*CysteinyI aspartate specific protease*" en 1996 (Alnemri *et al.*, 1996). Toutes les caspases ont une structure conservée et sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes. Les caspases sont constituées d'un pro-domaine N-terminal de longueur variable allant de 23 à 219 acides aminés, suivi d'un domaine de 17 à 21 kDa (P20) qui deviendra après clivage la grande sous-unité et enfin d'un domaine C-terminal de 10 à 14 kDa (P10) qui constituera la petite sous-unité.

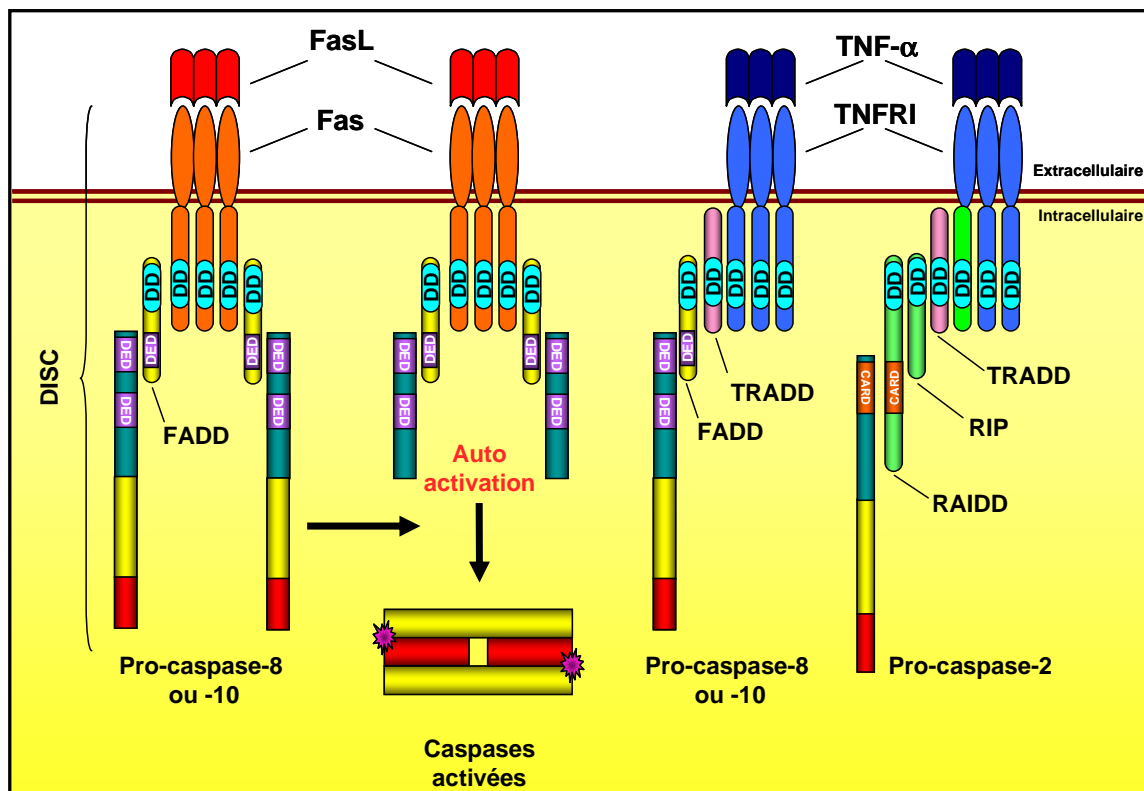
### **II.4.2.1. Classification des caspases**

A ce jour, 14 caspases ont été identifiées chez les mammifères (10 humaines et 4 murines) et peuvent être réparties en 3 groupes en fonction de leur structure et de leur réactivité : les caspases initiatrices, effectrices et activatrices de cytokines. La figure 5 schématise les structures protéiques des différentes caspases humaines et murines. (Lavrik *et al.*, 2005). Les pro-caspases initiatrices possèdent un pro-domaine N-terminal long contenant au moins 103 résidus (jusqu'à 200 résidus pour les pro-caspases-8 et -10). Les segments N-terminaux des caspases-8 et -10 contiennent des domaines effecteurs de mort (DED; *Death effector domain*), alors que les caspases-1,-2,-4 et -9 possèdent un domaine de recrutement des caspases (CARD; *Caspase recruitment domain*). Ces différents domaines (DED et CARD) sont impliqués dans le processus d'activation des caspases par des interactions protéines-protéines (voir chapitre II.4.2.3.4, p. 19, relatif à la régulation des caspases par interactions protéines-protéines). La maturation et l'activation des caspases effectrices dépendent des caspases initiatrices. La séquence des sites de clivage séparant les sous-unités des caspases effectrices correspond aux séquences consensus reconnues par les caspases initiatrices.

Certaines caspases comme les caspases-1, -4, -5, -11, -12, et -13 ne sont pas directement impliquées dans le processus apoptotique mais semblent plutôt jouer un rôle dans l'inflammation probablement en induisant le clivage de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et -18. La caspase-12, bien qu'appartenant à la sous famille des caspases inflammatoires, a été récemment décrite comme la caspase médiant l'apoptose au niveau du réticulum endoplasmique (Oyadomari *et al.*, 2002 ; Nhan *et al.*, 2006).

### **II.4.2.2 Mécanismes d'activation des caspases**

Comme le montre la figure 6, l'activation des caspases passe par le clivage protéolytique de la forme zymogène au niveau de 2 sites consensus contenant un résidu aspartique. Le clivage entre les sous-unités précède l'excision du pro-domaine N-terminal. Chaque caspase activée résulte du clivage protéolytique et de l'auto-association de 2 pro-caspases formant un ensemble tétramérique (homodimère d'hétérodimères) contenant 2 sites actifs situés aux extrémités de la



**Figure 7. Recrutement et auto-activation des caspases initiatrices par les récepteurs membranaires à DD.**

L'auto-activation des caspases initiatrices nécessite leur rapprochement stabilisé par interaction avec des récepteurs membranaires à DD. En fonction du type de pro-caspase et/ou du récepteur concerné, plusieurs molécules adaptatrices sont recrutées (d'après Lavrik *et al.*, 2005).

protéine. Le pro-domaine N-terminal semble jouer un rôle dans les interactions protéines-protéines et est impliqué dans la régulation de l'activité de ces caspases. Une propriété importante des caspases initiatrices est leur capacité à s'auto-activer et/ou d'être activées par d'autres caspases. Il peut donc y avoir une cascade d'activation entre les différentes caspases. Une fois les caspases initiatrices activées (mécanisme d'auto-activation), elles vont pouvoir cliver d'autres caspases encore à l'état de zymogène, notamment les caspases effectrices (mécanisme d'hétéro-activation).

#### **II.4.2.2.1. Auto-activation des caspases initiatrices**

L'auto-activation des caspases initiatrices implique l'oligomérisation des zymogènes, sous le contrôle de protéines adaptatrices. Ces molécules adaptatrices couplent les pro-caspases aux senseurs apoptotiques, tels que les récepteurs de mort ou la mitochondrie. Il en résulte une concentration locale élevée en pro-enzymes permettant la protéolyse inter- et intra-moléculaire.

##### *Activation des pro-caspases-2, -8, -10*

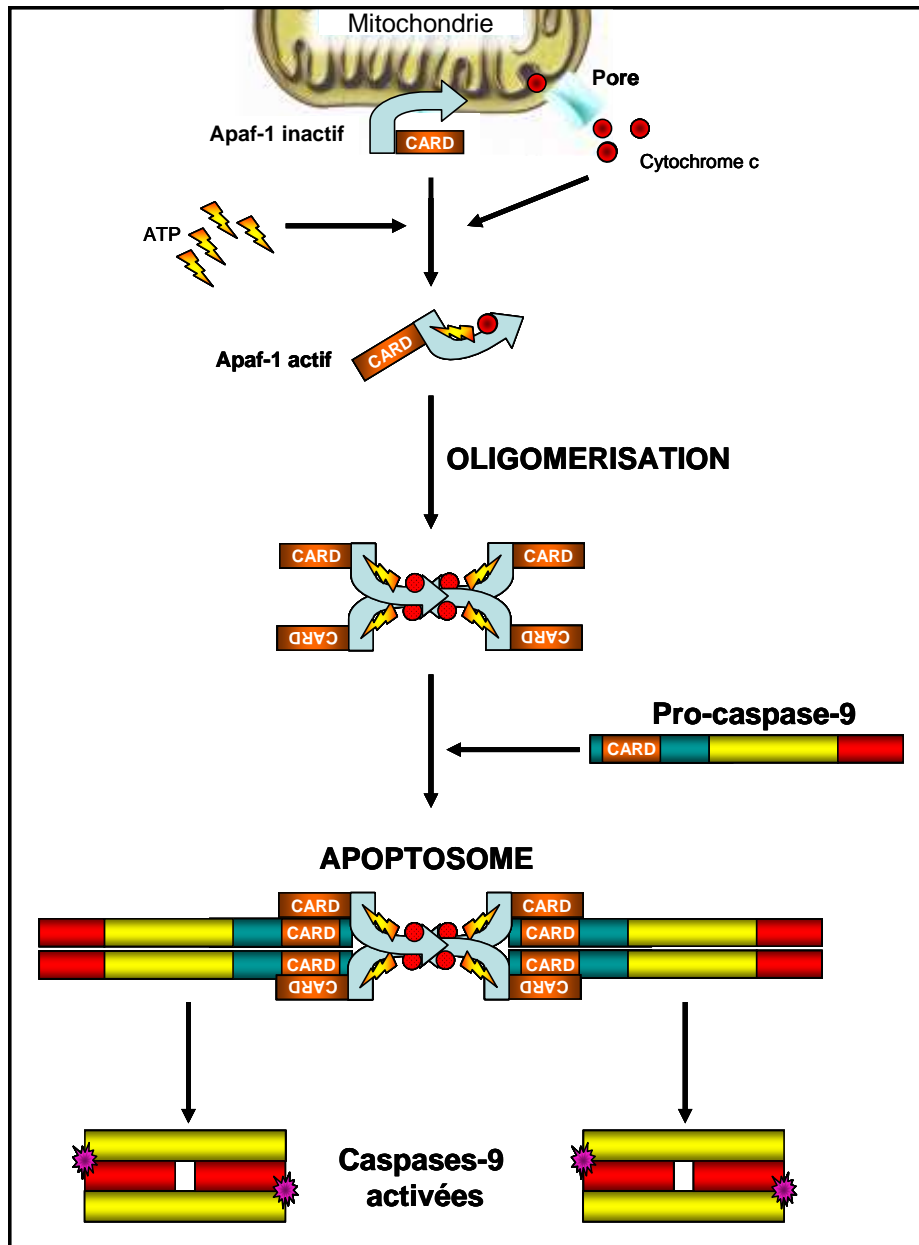
L'activation des caspases-2, -8, et -10 résulte de la stimulation de récepteurs membranaires possédant un motif intracellulaire riche en résidus cystéines et un domaine intracellulaire DD, domaine par lequel, en réponse à un ligand, les récepteurs trimérisent et recrutent des protéines adaptatrices. Comme le modélise la figure 7, la pro-caspase-8 (Kischkel *et al.*, 1995) ou la pro-caspase-10 (Kischkel *et al.*, 2001) s'oligomérisent par l'intervention de la protéine adaptatrice FADD (*Fas protein with DD*) au niveau de leur domaine DED. FADD, par son domaine DD, peut être directement couplé au récepteur Fas (Chinnaiyan *et al.*, 1995) ou indirectement au TNF-RI par l'intermédiaire de TRADD (*TNF-R associated protein with DD*) (Hsu *et al.*, 1995) Le complexe, ainsi constitué du récepteur, de FADD et de la pro-caspase, est nommé DISC (*Death-including signaling domains DED complex*).

Le recrutement de la pro-caspase-2 au récepteur se fait par l'interaction séquentielle de TRADD, avec la pro-caspase-2 via leur domaine CARD et avec d'autres protéines telles que la sérine/thréonine kinase RIP (*Receptor interacting protein*) et la protéine RAIDD (*RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with DD*) via leurs domaines DD (Hsu *et al.*, 1995 ; Stanger *et al.*, 1995 ; Duan et Dixit, 1997).

L'activation des pro-caspases initiatrices par interaction avec les récepteurs membranaires à DD est parfois appelée voie extrinsèque de l'apoptose. En effet cette voie est activée suite à un signal extracellulaire.

##### *Activation de la pro-caspase-9*

Le mécanisme de maturation de la pro-caspase-9 est comparable à celui des pro-caspases initiatrices-2, -8 et -10. Comme le modélise la figure 8 (page suivante), son activation dépend de la formation d'un complexe multi-protéique, l'apoptosome (Li *et al.*, 1997). L'apoptosome est constitué du cytochrome c libéré de la mitochondrie, d'Apaf-1 (*Apoptotic protease-activating factor-1*), d'ATP et de la pro-caspase-9 (Zou *et al.*, 1999). Dans ce complexe, Apaf-1 joue le rôle de protéine adaptatrice. Il possède en effet une région de liaison CARD, impliquée directement dans le recrutement de la pro-caspase-9 (Li *et al.*, 1997). Lorsque les cellules sont quiescentes, Apaf-1, est séquestré à la surface



**Figure 8. Activation de la caspase-9 via la formation de l'apoptosome.**

Suite à différents stimuli pro-apoptotiques, la mitochondrie libère plusieurs facteurs pro-apoptotiques dont le cytochrome c. Apaf-1, activé par le cytochrome c et l'ATP, s'oligomérisent et s'associent avec des pro-caspases-9 (le nombre d'unités est fictif) pour former l'apoptosome. Les pro-caspases-9 étant rapprochées et stabilisées s'auto-activent. Les caspases-9 activées peuvent exercer leur action pro-apoptotique (d'après Hengartner, 2000).

de la mitochondrie dans une conformation tridimensionnelle inactive (Zou *et al.*, 1997). Dans un contexte apoptotique, le cytochrome c et l'ATP lient Apaf-1, induisant un changement conformationnel permettant de démasquer alors la région CARD : la pro-caspase-9 est ainsi recrutée. L'existence d'un épissage alternatif pour l'ARNm codant pour la pro-caspase-9 a été proposé, identifiant deux formes, l'une inactive et anti-apoptotique, l'autre activable et pro-apoptotique (Srinivasula *et al.*, 1999).

L'activation des pro-caspases initiatrices via la formation de l'apoptosome et altération des structures mitochondriales est appelée voie intrinsèque de l'apoptose. En effet cette voie est généralement activée suite à un signal intracellulaire. Comme décrit dans le chapitre II.4.3., les molécules de la famille Bcl-2 sont particulièrement impliquées dans cette voie intrinsèque de l'apoptose.

#### **II.4.2.2. La transactivation des caspases effectrices**

Les caspases-3, -6 et -7, regroupées sous le nom de caspases effectrices, ne peuvent être activées par un mécanisme d'auto-activation. En effet, ces protéases disposent d'un domaine court incapable d'initier leur oligomérisation et leur activation. Ainsi leur clivage protéolytique est pris en charge par d'autres caspases, généralement des caspases initiatrices. Des études, menées sur des extraits cellulaires (Srinivasula *et al.*, 1996 ; Muzio *et al.*, 1997) ou sur des cellules de levures transfectées (Kang *et al.*, 1999), ont en effet démontré que les caspases initiatrices sont capables d'activer efficacement les caspases effectrices. Dans ces systèmes, l'activation protéolytique des caspases-3 et -7 par l'action directe des caspases-8 et -10 a été mise en évidence (Nagata, 1997 ; Stennicke *et al.*, 1998 ; Kang *et al.*, 1999). De même, la caspase-9 est capable d'induire l'activation des pro-caspases-3 et -7 (Li *et al.*, 1997 ; Srinivasula *et al.*, 1998). Alors que le clivage des procaspases-3 et -7 peut résulter de l'action directe des caspases-8, -9, -10, des expériences *in vitro* montrent que la pro-caspase-6 est clivée uniquement par les caspases-3 et -7 (Srinivasula *et al.*, 1998 ; Slee *et al.*, 1999). Ainsi, les caspases-8, -9, et -10 sont décrites comme les protéases gouvernant l'activation séquentielle des caspases effectrices dans l'apoptose médiée par les récepteurs membranaires ou par la mitochondrie. Ce type d'activation en cascade permettrait la régulation et l'amplification du signal apoptotique. Toutefois, des études *in vitro* démontrent que les caspases effectrices peuvent également cliver des caspases initiatrices. Par exemple, la caspase-3 est douée d'une activité protéolytique vis-à-vis de la pro-caspase-8 (Stennicke *et al.*, 1998) et des pro-caspases-2 et -9 (Slee *et al.*, 1999). La caspase-6 active est également capable de protéolyser les caspases initiatrices-8 et -10 (Slee *et al.*, 1999). Ces différents travaux suggèrent l'existence d'une boucle de rétrocontrôle *in vivo*.

Le tableau VI répertorie une liste non-exhaustive de protéines clivées par les caspases.

#### **II.4.2.3. Régulation des caspases**

La plupart des cellules animales expriment constitutivement plusieurs types de caspases, conservées sous leur forme inactive de pro-caspases. Etant donné que certaines de ces pro-caspases ont la capacité de s'auto-activer et d'engendrer, via une réaction d'activation en chaîne, un processus protéolytique irréversible et fatale pour la cellule, il n'est pas surprenant que ces protéines soient étroitement régulées tant au niveau de leur activation que de leur activité.

SUBSTRATS	EFFETS (supposés du clivage)	Références
<b>Protéines associées au cytosquelette membranaire :</b> -Actine, $\beta$ -caténine, Cohesine, Cytokératine, Desmine, FAK ( <i>Focal adhesion kinase</i> ), Fodrine, Gas-2 ( <i>Growth arrest specific-2</i> ), Gelsoline, ROCK-1 ( <i>Rho-associated coiled-coil protein kinase 1</i> ), Vimentine.	- Réarrangement du cytosquelette, bourgeonnement de la membrane plasmique, isolement cellulaire.	-Caulin <i>et al.</i> , 1997 ; Kothakota <i>et al.</i> , 1997 ; Herren <i>et al.</i> , 1998 ; Janicke <i>et al.</i> , 1998 ; Levkau <i>et al.</i> , 1998 ; Mashima <i>et al.</i> , 1999 ; Sgorbissa <i>et al.</i> , 1999 ; Buyn <i>et al.</i> , 2001 ; Sebbagh <i>et al.</i> , 2001 ; Chen <i>et al.</i> , 2003.
<b>Protéines du cytosquelette de l'enveloppe nucléaire :</b> -Lamine A et B.	- Déstabilisation du cytosquelette nucléaire, condensation de la chromatine.	-McConkey, 1996 ; Rao <i>et al.</i> , 1996
<b>Protéines kinases cytoplasmiques :</b> -Ca <sup>++</sup> -Calmoduline protéine kinase dépendante IV (CaMK IV), MEKK-1, Mst ½ ( <i>Mammalian sterile 20-homologues kinases</i> ), PAK-2 ( <i>p21-activated kinase</i> ), PKC $\delta$ , PKC $\mu$ , PKC $\tau$ , PKN.	- Perte de la régulation, activité augmentée, rôle pro-apoptotique.	-Ghayur <i>et al.</i> , 1996 ; Rudel et Bokoch, 1997 ; Graves <i>et al.</i> , 1998 ; McGinnis <i>et al.</i> , 1998 ; Takahashi <i>et al.</i> , 1998 ; Widmann <i>et al.</i> , 1998 ; Endo <i>et al.</i> , 2000
<b>Protéines interagissant avec l'ADN :</b> -Inhibiteur de DFF40/CAD (DFF45/ICAD [ <i>caspase-activated deoxyribonuclease</i> ]). -DNA-PKcs, PARP (Poly-adenosyl-ribose polymerase), topo-isomerase 1. -NuMA ( <i>Nuclear protein that associates with the mitotic apparatus</i> ).	-Libération de DFF40/CAD, fragmentation de l'ADN. -Inactivation, l'ADN n'est plus réparé. -Modification de la chromatine, altération de l'enveloppe nucléaire.	-Sakahira <i>et al.</i> , 1998 -Casciola-Rosen <i>et al.</i> , 1996 -Taimen et Kallajoki, 2003
<b>Facteurs de transcription :</b> -SRF ( <i>Serum response factor</i> ), STAT-1, NF- $\kappa$ B.	-Inhibition de la transcription de gènes anti-apoptotiques et/ou mitogéniques.	-King et Goodbourn, 1998 ; Ravi <i>et al.</i> , 1998 ; Bertolotto <i>et al.</i> , 2000.
<b>Protéines régulatrices de l'apoptose :</b> -Bax, Bcl-2, Bcl-x <sub>L</sub> , Bid.	-Génération de fragments pro-apoptotiques.	-Cheng <i>et al.</i> , 1997 ; Clem <i>et al.</i> , 1998 ; Grandgirard <i>et al.</i> , 1998 ; Li <i>et al.</i> , 1998.
<b>Protéines de l'inflammation :</b> -Pro-IL-1 $\beta$ . -Pro-IL-16. -Pro-IL-18.	-Libération d'IL-1 $\beta$ . -Augmente le chimiotactisme des lymphocytes T. -Stimule la synthèse d'IFN- $\gamma$ .	-Black <i>et al.</i> , 1989 ; Brough et Rothwell, 2007. -Zhang <i>et al.</i> , 1998. -Fantuzzi <i>et al.</i> , 1998.
<b>Autres protéines :</b> -I $\kappa$ B. -Calpastatine. -Protéine phosphatase 2A. -Phospholipase A2.	-Inhibition constitutive de NF- $\kappa$ B. -Diminution de l'inhibition des calpaïnes. -Augmentation de l'activité. -Activation.	-Barkett <i>et al.</i> , 1997. -Wang <i>et al.</i> , 1998. -Santoro <i>et al.</i> , 1998. -Adam-Klages <i>et al.</i> , 1998.
<b>Tableau VI. Substrats des caspases.</b> Liste non exhaustive de différentes protéines clivées par les caspases (d'après Earnshaw <i>et al.</i> , 1999).		

#### **II.4.2.3.1. Régulation par phosphorylation**

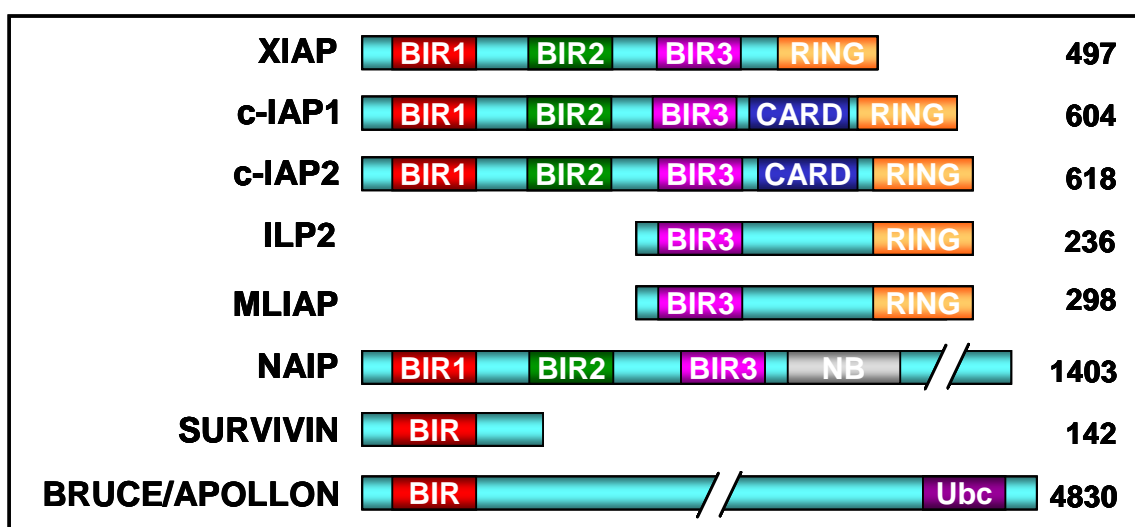
Les caspases sont des phosphoprotéines, cibles de différentes protéines kinases telles que Akt, Protéine Kinase (PK) C, PKA, p38 MAPK (*Mitogen activated protein kinase*), etc. Il a été montré que le degré de phosphorylation des pro- et/ou caspases module leur activation/activité (Anderson, 1997 ; Cardone *et al.*, 1998 ; Martins *et al.*, 1998 ; Allan *et al.*, 2003 ; Alvarado-Kristensson *et al.*, 2004 ; Brady *et al.*, 2005 ; Martin *et al.*, 2005). Il a également été montré que la caspase-3 phosphorylée pouvait être réactivée par déphosphorylation via l'activité de la protéine phosphatase A2 (PPA2) (Alvarado-Kristensson et Andersson, 2005)

#### **II.4.2.3.2. Régulation Redox des caspases**

Il a été montré, *in vitro*, que la formation de FRO est susceptible de moduler directement l'activité des caspases. En effet, le site catalytique des caspases contient un résidu aminé cystéine. Pour que l'enzyme soit actif, le groupement thiol de ce résidu doit être sous forme réduite. L'oxydation de ce groupement diminue l'activité des caspases (Nobel *et al.*, 1997 ; Fadeel *et al.*, 1998 ; Hampton *et al.*, 1998b). Cependant, alors qu'il a été montré que les FRO inhibent directement l'activité des caspases, elles introduisent aussi des altérations de la mitochondrie, provoquent la MPT et, indirectement, favorisent l'activation des pro-caspases (Kluck *et al.*, 1997 ; Stridh *et al.*, 1998). Le rôle des FRO dans la régulation des pro-caspases reste donc à éclaircir.

#### **II.4.2.3.3. Régulation topographique**

L'étude du rôle des caspases dans l'apoptose est rendue d'autant plus difficile du fait qu'il peut exister des différences dans la localisation intracellulaire entre pro-caspases et caspases activées. La séquestration des pro-caspases dans des compartiments cellulaires différents (comme la mitochondrie, le noyau, le cytoplasme) semble constituer un mode de régulation important, en limitant, par l'existence de barrières physiques, leur activation et en les maintenant à distance de leurs substrats ou de molécules activatrices dans les cellules en vie. Il a notamment été montré que les pro-caspases-2, -9 (Susin *et al.*, 1999a), -3 (Mancini *et al.*, 1998) et -8 (Qin *et al.*, 2001) peuvent être localisées dans l'espace inter-membranaire mitochondrial. Ce n'est qu'en présence d'un signal apoptotique qu'elles sont libérées dans le cytoplasme et clivées en caspases actives. D'autre part, les caspases semblent également pouvoir migrer du cytoplasme vers le noyau. En effet, la présence de la caspase-9 active dans le noyau de neurones et de cardiomyocytes (Susin *et al.*, 1999a) a été démontrée. La localisation nucléaire transitoire de la caspase-3 a également été mise en évidence (Krajewska *et al.*, 1997). Enfin, la découverte d'un signal de localisation nucléaire dans le pro-domaine de la pro-caspase-2 (Colussi *et al.*, 1998) est un autre argument pour proposer un rôle fonctionnel des caspases au niveau du noyau.



**Figure 9. Les protéines IAP humaines.**

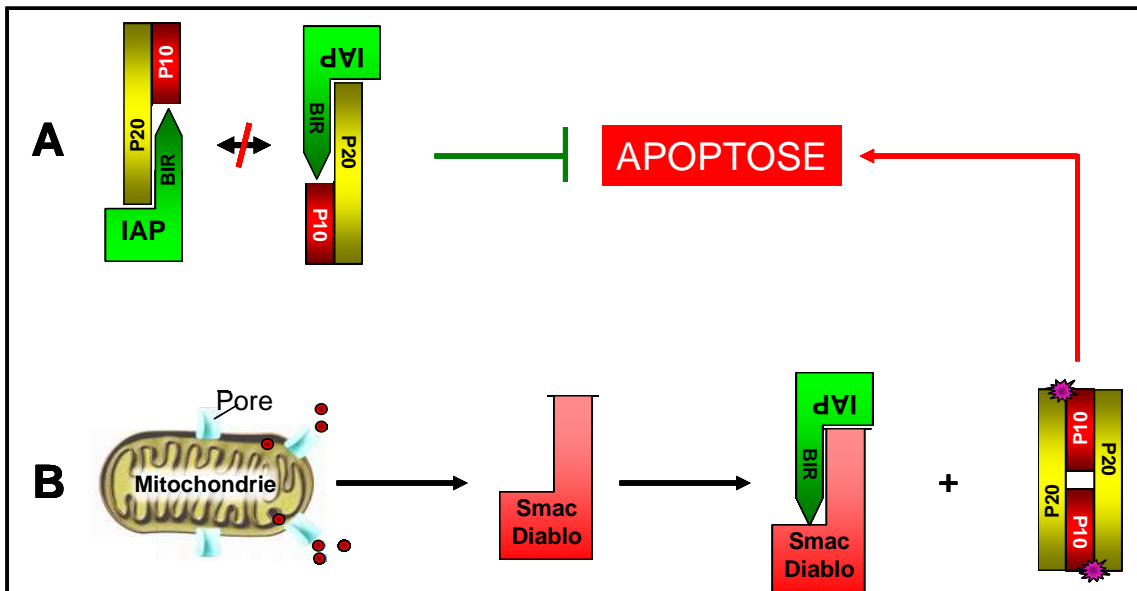
Représentation des domaines des protéines humaines de la famille IAP. Les nombres correspondent aux acides aminés. Toutes les protéines contiennent au moins un domaine BIR, et certaines comportent un domaine CARD, Ubc (*Ubiquitin-conjugating*) et RING (d'après Delhalle, 2002 ; Schimmer, 2005).

#### II.4.2.3.4. Régulation par interactions protéines-protéines

Comme il a déjà été mentionné, certaines caspases, spécialement les caspases initiatrices, requièrent l'association par leur domaine DED et CARD de protéines adaptatrices telles que FADD, TRADD, RAIDD et RIP pour être pleinement activées. De façon similaire, cette étape de recrutement des caspases initiatrices aux récepteurs DD peut être régulée négativement par une protéine nommée FLIP (*FLICE (caspase-8) inhibitory protein*), identifiée initialement chez le virus de l'herpès et le virus molluscipox. FLIP contient deux domaines DED qui lui permettent de lier la protéine adaptatrice FADD et/ou les caspases-8 et -10 (Thome *et al.*, 1997), les rendant ainsi inaccessibles lors de la mise en place du complexe DISC (Droin *et al.*, 2001). La grande famille des protéines de Bcl-2 joue un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose en contrôlant la libération du cytochrome c de la mitochondrie et l'activation séquentielle de la caspase-9 et des caspases effectrices. Cependant, la libération du cytochrome c n'apparaît pas comme suffisante pour induire l'activation de la caspase-9 et des caspases effectrices. En effet, des protéines appartenant à la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP; *inhibitor of apoptosis proteins*) maintiennent la caspase-9 et les caspases effectrices-3, -7 inactives selon un mécanisme d'inhibition compétitive (Deveraux et Reed, 1999). Cette inhibition est levée notamment par des protéines mitochondriales, Smac (*Second mitochondria-derived activator of caspase*) et son homologue Diablo (*Direct IAP binding protein and low pI*), lesquelles sont libérées dans le cytosol au cours du processus apoptotique (Du *et al.*, 2000)

#### II.4.2.3.5. Les protéines inhibitrices de l'apoptose

Les protéines IAP inhibent la mort cellulaire en empêchant, par liaison compétitive, le clivage des pro/caspases et leur activation subséquente. Initialement détectées chez certains virus (Crook *et al.*, 1993), des homologues ont été identifiés chez les insectes et les mammifères. La figure 9 schématise les séquences polypeptidiques des 8 membres de la famille IAP actuellement identifiés : X (*X-linked*) IAP, c (*cytoplasmic*)-IAP1, c-IAP2, N (*Nucleotide binding*) IAP, ML (*Melanoma and Lymphoma*) IAP, ILP2 (*IAP-like protein-2*), Survivine, Bruce/Apollon (Schimmer, 2004). Les IAP sont constituées de différents domaines protéiques dont les domaines BIR (*Baculoviral IAP repeat*), longs de  $\pm 70$  acides aminés, qui sont indispensables à l'activité anti-apoptotique de IAP. Chaque domaine BIR possède des fonctions distinctes et une spécificité de liaison aux caspases (Verhagen *et al.*, 2001). BIR-1 et -2 assurent la liaison et l'inhibition de l'activité des caspases-3 et -7 alors que BIR-3 inhibe l'activation et l'activité de la caspase-9. XIAP est le membre dont la fonction ou la régulation sont les mieux connues. Un défaut ou un excès de l'expression des IAP est à l'origine de maladies telles que l'amyotrophie spinale (déficience en NIAP) (Roy *et al.*, 1995). Un déficit en Survivine est souvent impliqué dans différents cancers (Ambrosini *et al.*, 1997). Il a été montré que les membres c-IAP1 et c-IAP2 peuvent jouer leurs rôles anti-apoptotiques au début du processus d'apoptose induit par le TNF- $\alpha$  en se liant à TRAFF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) et en inhibant ainsi la liaison de la caspase-8 (Rothe *et al.*, 1995). Cependant et comme déjà cité dans le précédent paragraphe, les IAP peuvent, elles-mêmes, être régulées de manière négative notamment par les protéines Smac/Diablo.



**Figure 10. Mécanismes de l'inhibition des caspases par les IAP.**

**A. Situation non-apoptotique :** Les domaines BIR des protéines IAP se lient aux formes clivées dimériques des caspases-9, -3 et -7. Cette inhibition compétitive empêche l'association des hétérodimères de caspases et leur activation. **B. Situation apoptotique :** La protéine Smac/Diablo est libérée de l'espace inter-membranaire mitochondrial et se lie avec les protéines IAPs. La formation de complexes entre IAP et Smac/Diablo autorise l'association des hétérodimères de caspases. Celles-ci peuvent dès lors induire la mort cellulaire (d'après Goyal, 2001).

#### II.4.2.3.6. Les inhibiteurs de IAP

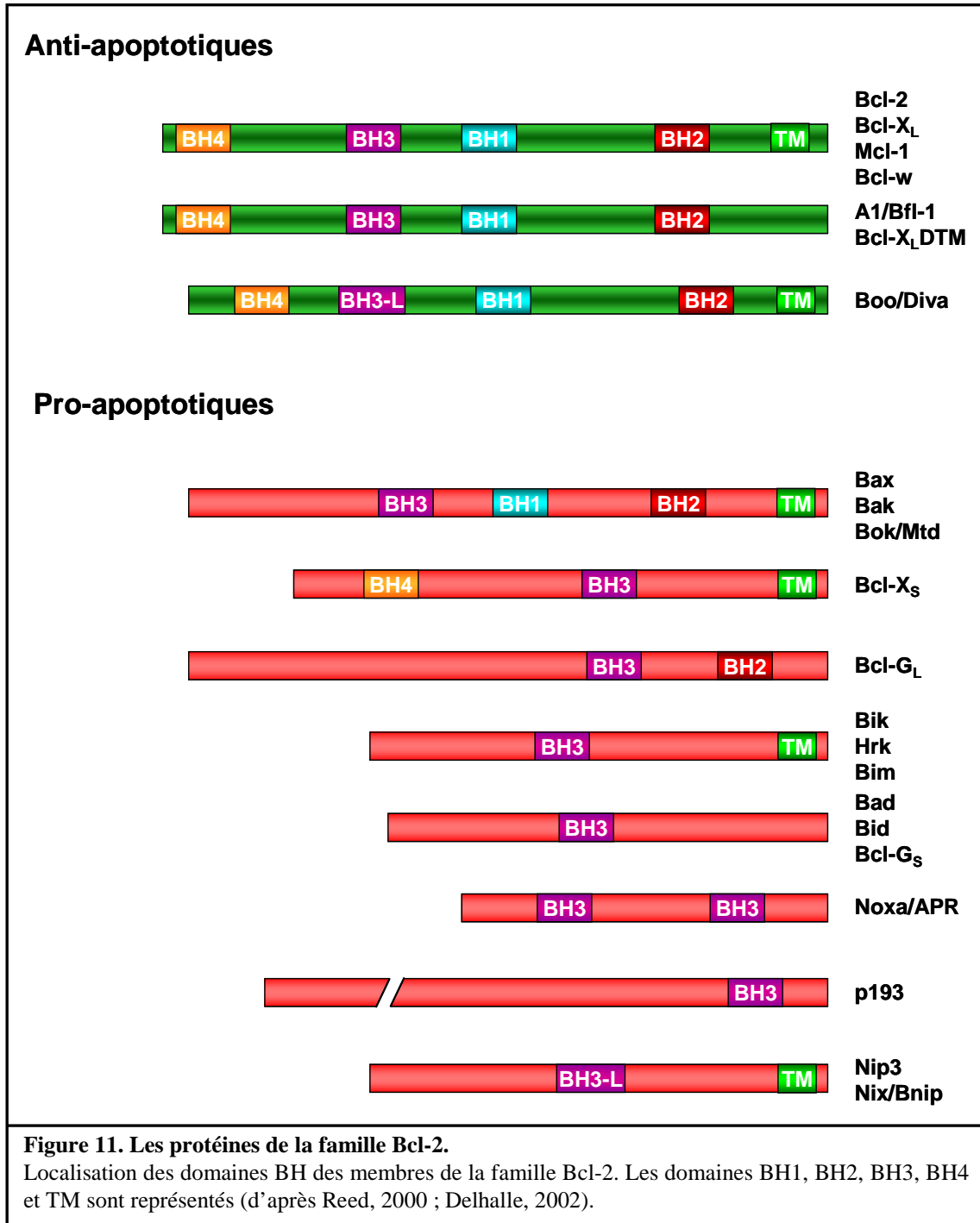
Smac/Diablo sont des protéines mitochondriales contenant une séquence de localisation mitochondriale qui est éliminée lors de l'importation vers la mitochondrie (Du *et al.*, 2000). Ce retrait génère une nouvelle extrémité dont les 4 premiers résidus, AVPI (ala-val-pro-ile), se lient au(x) domaine(s) BIR des IAP. Cette interaction les empêchant d'inhiber les caspases, probablement par encombrement stérique (Chai *et al.*, 2001 ; Verhagen *et al.*, 2001). La figure 10 modélise le mode d'action des IAP et de leurs inhibiteurs mitochondriaux, Smac/Diablo.

XAF-1 (*X-IAP associated factor-1*) est une autre protéine capable d'activer les caspases. Protéine nucléaire, XAF-1 séquestre XIAP dans le noyau par interaction de leurs motifs protéiques en doigt à zinc [RING]. De cette façon, XIAP est maintenu dans le noyau et la cellule devient plus sensible à un signal de mort. L'expression de XAF-1 semble être réduite dans certains cancers (Liston *et al.*, 2001). La protéine Omi/HtrA2 (*High temperature requirement protein A2*) a été identifiée comme nouvelle protéine inhibitrice des IAP (Verhagen *et al.*, 2001). HtrA2 est une sérine-thréonine protéase qui reste confinée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial. Lorsque l'apoptose est induite, cette protéine est libérée dans le cytoplasme et se lie aux IAP de la même façon que Smac/Diablo facilitant ainsi l'activation des caspases. L'activité protéasique de HtrA2 est indépendante de son rôle inhibiteur de IAP (Suzuki *et al.*, 2001 ; Hegde *et al.*, 2002).

#### II.4.2.4. L'apoptose caspase indépendante

Bien que l'activité des caspases dans le processus apoptotique soit bien établie, il a été montré que l'apoptose peut être induite sans la participation des caspases. AIF, est une protéine homologue à la ferredoxine bactérienne ou aux NADH-oxydoréductases, mais qui présente également une activité protéasique (Susin *et al.*, 1996 ; 1999b ; Daugas *et al.*, 2000). AIF, localisée initialement dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, est libérée dans le cytoplasme et transloquée dans le noyau suite à un stimuli pro-apoptotique. Une fois dans le noyau, elle est capable d'induire à elle seule la condensation de la chromatine nucléaire et de générer des fragments d'ADN de grandes tailles (50 kpb) par interaction directe avec l'ADN sans spécificité de séquence (Susin *et al.*, 1999b ; Daugas *et al.*, 2000 ; Ye H. *et al.*, 2002).

L'endonucléase G, nucléase mitochondriale probablement impliquée dans la réplication du génome mitochondrial, est libérée dans le cytosol et est transloquée vers le noyau suite à un signal pro-apoptotique (Li *et al.*, 2001). Dans le noyau, elle digère l'ADN en l'absence d'activité caspase et génère à la fois des fragments de grandes tailles mais également des fragments oligonucléosomiques (Samejima *et al.*, 2001 ; Widlack *et al.*, 2001).



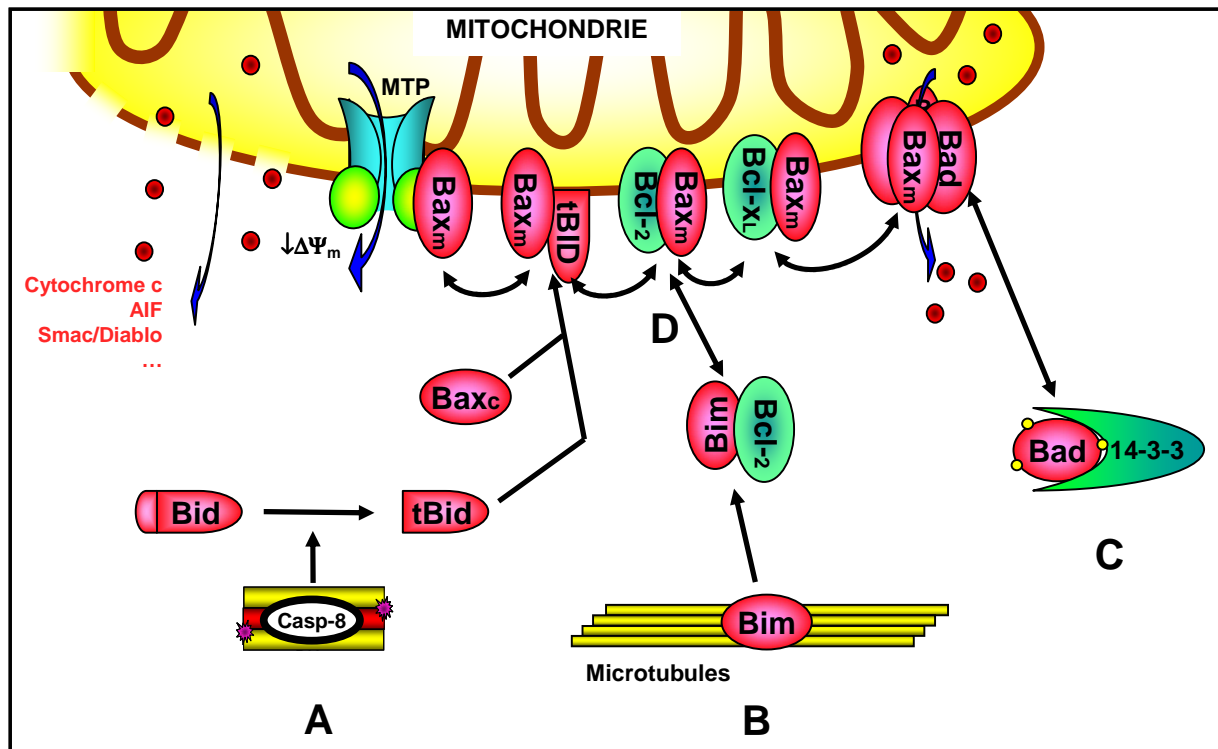
### **4.3. La famille Bcl -2**

L'étude des mutations géniques liées aux lymphomes folliculaires de type B a conduit à l'identification du proto-oncogène Bcl-2 (Tsujimoto *et al.*, 1984). Depuis sa découverte, Bcl-2 s'est révélée faire partie d'une famille sans cesse croissante de protéines régulatrices de l'apoptose. Ces protéines sont de véritables senseurs internes, contrôlant "l'état de santé" de la cellule. Si l'on se réfère à leur fonction biologique ainsi qu'à leur structure protéique, les protéines de la famille Bcl-2 peuvent être classées en deux sous-famille : les protéines Bcl-2 pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bad, Bid, Bcl-x<sub>S</sub>, *etc*) et les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, A1/Bfl-1, *etc*). La figure 11 répertorie et schématise les séquences polypeptidiques des membres de la famille Bcl-2 humains.

Les membres de la famille Bcl-2 ont une structure polypeptidique conservée et sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs domaines BH (*Bcl-2 Homology domain*). Les domaines BH1, -2, et -3 forment une poche hydrophobe capable de s'associer avec un domaine BH3 appartenant à une autre protéine (Gross *et al.*, 1999). Le domaine BH4, présent chez tous les membres Bcl-2 anti-apoptotiques, ainsi que les régions avoisinantes peuvent être phosphorylés. Cette propriété permet à ces protéines d'être régulées et de s'associer avec d'autres protéines, telle que la calcineurine (Shibasaki *et al.*, 1997). Tous les membres Bcl-2 à l'exception de Bid et Bad possèdent un domaine peptidique C-terminal hydrophobe de 20 acides aminés qui permet aux protéines de s'ancrer dans une membrane (TM ; domaine protéique trans-membranaire) (Krajewski *et al.*, 1993). Certaines protéines Bcl-2 comme par exemple Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-x<sub>S</sub> sont les produits d'un épissage alternatif d'un même pré-ARN messager et peuvent avoir une fonction biologique opposée (Reed, 1999).

Les membres pro-apoptotiques peuvent être répartis en 3 groupes en fonction de leur structure et de leur activité: (i) Bad, Bik, Bim, Hrk, Bcl, P193, APR (Noxa) ne possèdent qu'un domaine BH3 et sont cytoplasmiques. Les protéines se comportent en inhibiteurs trans-dominants des membres anti-apoptotiques en venant insérer leur chaîne BH3 dans la poche hydrophobe BH1, -2, -3 des membres anti-apoptotiques, empêchant ces derniers d'assurer leur rôle (Kelekar et Thompson, 1998). (ii) Bax, Bak, Bok, sont des protéines possédant 3 domaines BH et ont une structure similaire à celle de certaines toxines bactériennes. Par analogie de fonction, ces membres seraient impliqués dans la formation de pores membranaires. Bien que Bid ne possède que le domaine BH3, sa structure peptidique ainsi que sa capacité à s'insérer dans une membrane le fait appartenir à ce second groupe. (iii) Nip3 et Nix définissent un troisième groupe, celui des "BH3-like", leur rôle pro-apoptotique reste encore mal connu aujourd'hui (Chen *et al.*, 1997).

La caractéristique importante des protéines de la famille de Bcl-2 est de pouvoir former des homo- ou des hétéro-dimères. Il semble en fait que l'équilibre entre la vie ou la mort soit influencé par le type et la proportion de dimères anti- ou pro-apoptotiques (Oltvai *et al.*, 1993). Ainsi, la formation majoritaire de dimères anti-apoptotiques préserve la vie cellulaire, alors que la présence accrue de dimères pro-apoptotiques conduit vers la mort cellulaire. La proportion de chaque type de dimères dépend de l'expression et de la localisation de ces protéines, de leur niveau de phosphorylation ou encore de clivages protéolytiques. Le mécanisme prédominant par lequel les membres de la famille Bcl-2 régule l'apoptose semble être le contrôle de la formation de l'apoptosome, en modulant la fuite mitochondriale du cytochrome c.



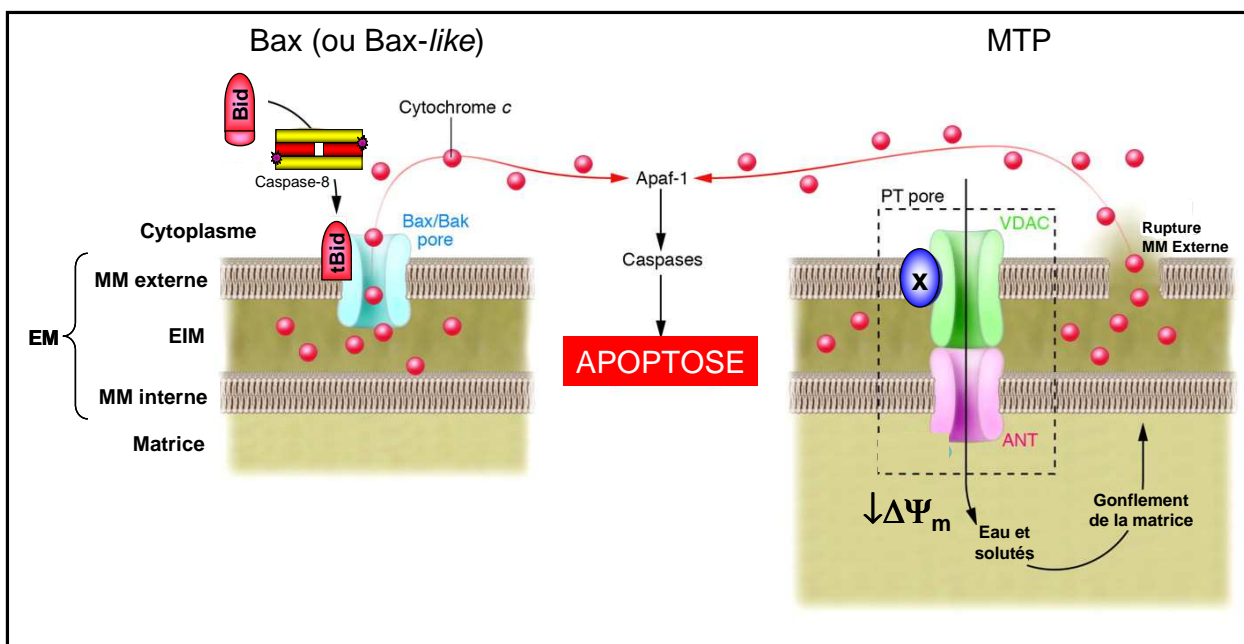
**Figure 12. Exemples de mécanismes par lesquels les membres de la famille Bcl-2 régulent l'apoptose.**

A. La caspase-8 active clive la protéine Bid en tBid. Ce fragment induit un changement conformationnel de Bax<sub>c</sub> en Bax<sub>m</sub>. L'ensemble s'insère dans la membrane mitochondriale et provoque la sortie du cytochrome c soit en participant à la formation du MTP soit par homo-oligomérisation ou hétéro-oligomérisation avec d'autres protéines Bax-like comme Bad. B. Suite à un dommage au niveau du cytosquelette (microtubules), la protéine Bim est libérée et empêche par inhibition compétitive l'action anti-apoptotique de Bcl-2. C. Suite à une activation par déphosphorylation, la protéine Bad est libérée de la protéine 14-3-3. D. Les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques lorsqu'elles ne sont pas elles-mêmes inhibées, stabilisent la membrane mitochondriale externe et empêchent l'action des membres Bcl-2 pro-apoptotiques (d'après Gross, 1999 ; Hengartner, 2000).

Les membres anti-apoptotiques qui possèdent un domaine C-terminal trans-membranaire se situent constitutivement au niveau des membranes des organites cellulaires (essentiellement au niveau de la membrane externe de la mitochondrie mais aussi au niveau des membranes du réticulum endoplasmique et du noyau) (Green et Reed, 1998 ; Danial et Korsmeyer, 2004). Divers travaux démontrent que les protéines anti-apoptotiques sont surtout impliquées dans le maintien de l'intégrité mitochondriale. En effet Bcl-2 ou ses homologues anti-apoptotiques sont capables de bloquer la génération de FRO (Kane *et al.*, 1993), de stabiliser le potentiel transmembranaire en régulant le flux de protons (Vander Heiden *et al.*, 1999), ou encore de moduler l'homéostasie du calcium mitochondrial (Zhu *et al.*, 1999). Le blocage de la sortie du cytochrome c par les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques peut être décrit comme la conséquence de leurs effets protecteurs sur l'homéostasie mitochondriale. Bcl-2 préviendrait la fuite du cytochrome c en compensant le déséquilibre ionique, probablement à l'origine de la baisse de  $\Delta\Psi_m$ , de l'ouverture des mégapores et de la rupture de la membrane externe mitochondriale. Les protéines anti-apoptotiques régulent donc plus la physiologie mitochondriale que la simple redistribution du cytochrome c. Au contraire, les protéines pro-apoptotiques telles que Bid, Bim, Bad et Bax, qui sont ordinairement présentes dans le cytoplasme, peuvent après stimulation se relocaliser majoritairement au niveau de la membrane mitochondriale externe et provoquer directement ou indirectement la libération du cytochrome c selon des mécanismes variés. Bax qui contient un domaine d'ancrage membranaire C-terminal est présent dans les cellules saines dans une conformation latente dans laquelle ce domaine d'ancrage membranaire est "emprisonné" dans le reste de la protéine (Nechushtan *et al.*, 1999). A la suite de différents stimuli apoptotiques, Bax subit un changement conformationnel libérant son domaine d'ancrage membranaire et se relocalise au niveau de la membrane mitochondriale externe (Hsu *et al.*, 1997 ; Wolter *et al.*, 1997 ; Suzuki *et al.*, 2000 ; Danial et Korsmeyer, 2004 ; Kuwana *et al.*, 2005). La figure 12 modélise différentes interactions entre les protéines de la famille Bcl-2.

Les protéines de la famille Bcl-2 peuvent être régulées de différentes façons : interaction protéines-protéines, (dé)phosphorylation, activation par clivage, séquestration, modification de l'expression des gènes par épissage alternatif, *etc.* La figure 12 modélise, à titre d'exemples, quelques voies de régulation de l'apoptose via la régulation des protéines de la famille Bcl-2.

L'exemple le plus caractéristique de la régulation par phosphorylation est celui de la protéine Bad. Sa localisation subcellulaire et sa translocation du cytosol vers la mitochondrie sont sous le contrôle d'enzymes de phosphorylation activées en présence de facteurs de survie, telles que Akt (del Peso *et al.*, 1997), Raf-1 (Wang *et al.*, 1994), et d'une phosphatase, la calcineurine (Wang *et al.*, 1999), activée au cours de processus apoptotique. A l'état phosphorylé, Bad est séquestré dans le cytosol en se liant avec une protéine soluble nommée 14-3-3, alors que la déphosphorylation de Bad permet sa translocation vers la mitochondrie et la formation de dimères pro-apoptotiques ou d'hétéro-dimères avec Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> supprimant ainsi leur fonction anti-apoptotique (Datta *et al.*, 1999). Bad est inactivé par phosphorylation dans de nombreux cancers (Datta *et al.*, 1999). Bcl-2 est également une phosphoprotéine. La phosphorylation de Bcl-2 potentialise sa fonction anti-apoptotique sans affecter sa localisation subcellulaire (la mitochondrie) (Haldar *et al.*, 1995 ; Chang *et al.*, 1997 ; Ito *et al.*, 1997 ; Poommipanit *et al.*, 1999). Bcl-2 peut être phosphorylé par différentes kinases, comme la PKC- $\alpha$  (Ruvolo *et al.*, 1998). Le taux de phosphorylation de cette protéine est cependant modulé par la PPA2 (Ruvolo *et al.*, 1999), enzyme activée par les céramides, orientant ainsi la cellule vers la mort. *In fine*, la transmission du signal de mort via la relocalisation membranaire des membres Bcl-2 pro-apoptotiques aboutit à la libération du cytochrome c et à l'activation de cofacteurs apoptogènes. Alors que l'adressage mitochondrial



**Figure 13. Schéma explicatif de la théorie du pore mitochondrial permettant la libération de différents facteurs apoptotiques dont le cytochrome c.**

Le cytochrome c est libéré depuis l'espace inter-membranaire (EIM) suite au changement de perméabilité des membranes mitochondriales (MM) de l'enveloppe mitochondriale (EM). Ces changements sont dus à la formation de pores mitochondriaux de deux types. L'un est le fruit de l'oligomérisation des protéines pro-apoptiques Bax. L'autre, la MTP, fait intervenir des composants constitutivement présents au niveau des MMs comme le canal ionique à voltage dépendant (VDAC), l'ANT, et d'autres protéines X (hexokinase, récepteurs aux benzodiazépines, cyclophiline D, créatine kinase, Bax, ...)(d'après Bouchier-Hayes, 2005).

de Bad est sous le contrôle de l'état de phosphorylation, la translocation de Bid du cytosol vers la mitochondrie résulte d'un clivage protéolytique par la caspase-8 (Li *et al.*, 1998). Les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 peuvent également subir des clivages protéolytiques par des caspases, qui aboutissent à la génération de fragments C-terminaux pro-apoptotiques (Cheng *et al.*, 1997). Enfin, exemple de régulation par localisation cellulaire, Bim est, dans une cellule saine, associé aux microtubules par sa liaison à la dynéine (Puthalakath *et al.*, 1999 ; Strasser, 2005). Suite à une altération du cytosquelette et à la rupture de cette interaction, Bim se relocalise à la surface de la mitochondrie et inhibe l'action anti-apoptotique des membres anti-apoptotiques de façon similaire à Bad.

Comme le modélise la figure 13, deux mécanismes de régulation de la libération du cytochrome c par les protéines de la famille de Bcl-2 ont été proposés. Ces protéines contrôlèrent l'ouverture des mégapores mitochondriaux en se liant avec une protéine constitutive de ce complexe, l'ANT (*Adenosine nucleotide translocator*) (Marzo *et al.*, 1998a ; Shimizu *et al.*, 2000), induisant ainsi la MPT, l'effondrement de  $\Delta\Psi_m$  et la rupture de la membrane externe mitochondriale. Mais la formation de grands canaux à cytochrome c est également proposée. Il a été montré que Bax a la capacité de polymériser (Antonsson *et al.*, 2000) et de s'insérer dans la membrane mitochondriale pour former de grands canaux permettant le passage de cytochrome c (Antonsson *et al.*, 2001), et cela sans gonflement osmotique ni rupture physique de la membrane (Martinou *et al.*, 1999).

#### **II.4.4. Les céramides**

Les céramides, lipides appartenant au groupe des sphingolipides, sont impliquées dans la régulation de diverses réponses cellulaires, comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Perry et Hannun, 1998). Le mode d'action et la régulation de la production des céramides ont été particulièrement investigués au cours des dix dernières années, du fait d'un rôle émergent des céramides comme effecteur moléculaire de l'apoptose. Plusieurs études ont montré en effet une production de céramides intracellulaires dans les cellules apoptotiques, précédant l'apparition des atteintes biochimiques et morphologiques de l'apoptose, suggérant que les céramides peuvent être impliquées dans la transduction du signal menant à la mort cellulaire (Hannun, 1996 ; Kolesnick et Krönke, 1998 ; Mathias *et al.*, 1998 ; Ogretmen et Hannun, 2004). Les céramides sont composées d'une sphingosine et d'une chaîne d'acide gras de longueur variable allant de 14 à 24 carbones.

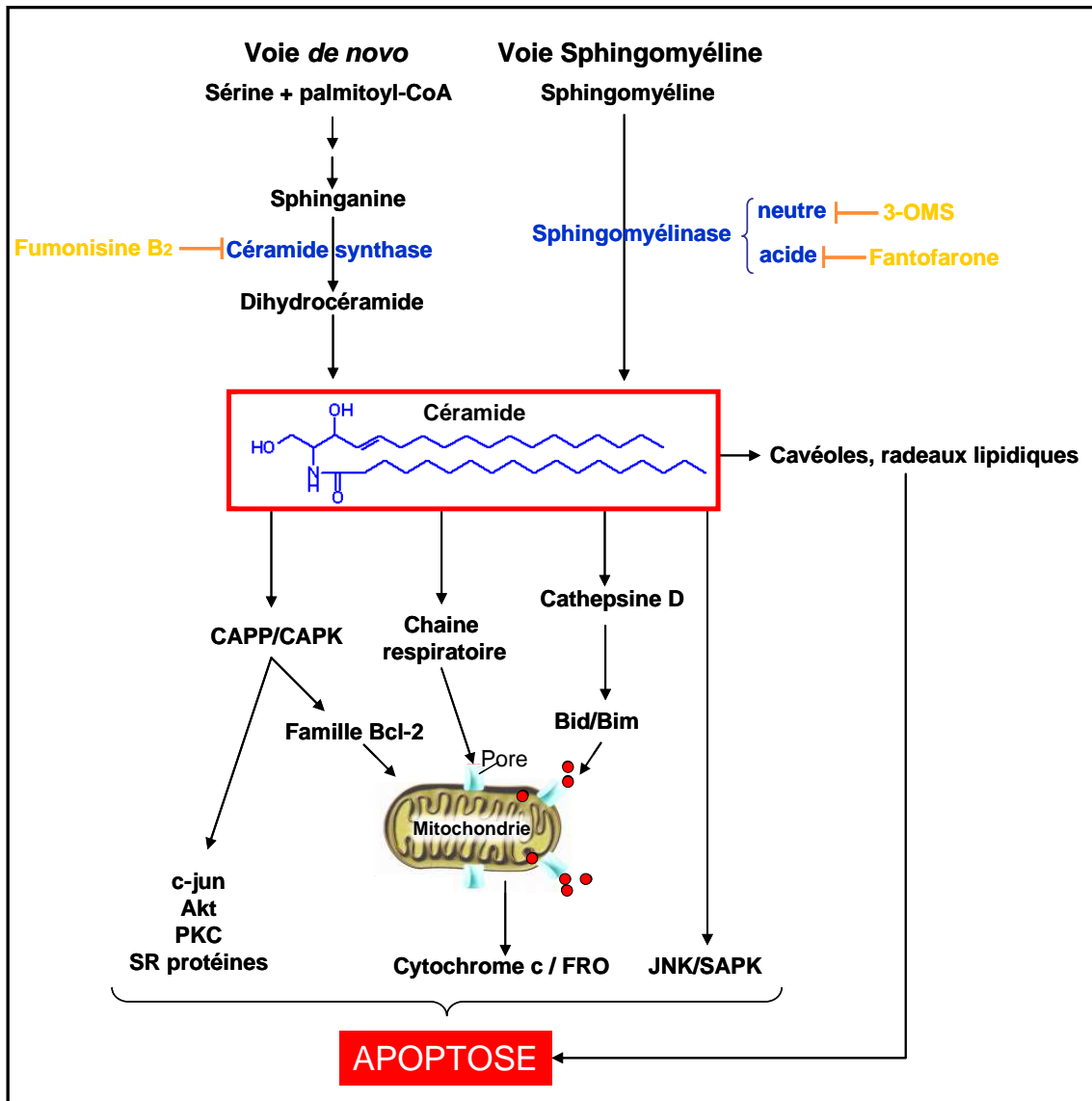
##### **II.4.4.1. Métabolisme des céramides**

Les céramides occupent un rôle central dans le métabolisme des sphingolipides. Elles sont générées principalement par deux voies de biosynthèse. D'une part, par hydrolyse du principal sphingolipide des membranes, la sphingomyéline (SM), via l'action d'enzymes spécifiques : les sphingomyélinases neutre (NSMase) ou acide (ASMase) et phospholipase C SM spécifique. D'autre part les céramides peuvent être générées par la voie dite *de novo* qui commence par la condensation d'un acide aminé sérine avec du palmitoyl-Coenzyme A (Kolesnick, 2002 ; Kolesnick et Fuks, 2003 ; Ogretmen et Hannun, 2004). Par ailleurs, une fois synthétisées, les céramides peuvent servir de substrat à la synthèse de nombreux métabolites tels que la sphingosine-1-phosphate (S1P), les sulfatides, les gangliosides. Les figures 14 et 15 (pages suivantes), résument les différentes voies du métabolisme des céramides.

#### II.4.4.2 Accumulation des céramides

Dans de nombreux types cellulaires, l'apoptose est associée avec une accumulation des céramides. Cette accumulation résulte de l'activation de la biosynthèse *de novo* ou de l'hydrolyse de SM par diverses SMases. Les céramides générées *de novo* s'accumulent majoritairement au niveau du feuillet membranaire cytoplasmique du réticulum endoplasmique du fait de la présence à ce niveau d'enzymes intervenant dans le métabolisme des céramides, à savoir la désaturase et la dihydrocéramide réductase (Michel *et al.*, 1997). On retrouve également, en fonction du type cellulaire, une accumulation de céramides associées à une activité SMase dans les lysosomes (ASMase) (Kanfer *et al.*, 1966), le noyau (NSMase) (Tamiya-Koizumi *et al.*, 1989 ; Alessenko et Chatterjee, 1995) et les mitochondries (NSMase) (Birbes *et al.*, 2001). L'activation de ces voies enzymatiques peut être modulée par des stimuli physiologiques ou environnementaux. Il a été démontré que la voie de synthèse *de novo* peut être activée après stimulation au TNF- $\alpha$  (Xu *et al.*, 1998), traitement avec des acides gras libres comme le palmitate (Paumen *et al.*, 1997), traitement avec des drogues cytotoxiques (la daunorubicine (Bose *et al.*, 1995), l'hexadécylphosphocholine (Wieder *et al.*, 1998) et l'étoposide (Perry *et al.*, 2000)), des radiations ionisantes (Farrell *et al.*, 1998), en réponse à des lymphotoxines (Plo *et al.*, 1999), *etc.* Ces stimuli se traduisent par l'augmentation de l'activité des enzymes sérine-palmitoyl transférase et céramide synthase associée généralement à une augmentation de leur niveau d'expression, suggérant l'implication de certains facteurs transcriptionnels comme p53 (Paumen *et al.*, 1997 ; Dbaibo *et al.*, 1998 ; Farrell *et al.*, 1998 ; Bose *et al.*, 1995 ; Boland *et al.*, 1997).

Diverses études ont montré le rôle joué par la voie des SMases dans la formation et l'accumulation des céramides au cours du processus apoptotique. La voie d'activation des SMases est dépendante du type cellulaire et du type de stimulus. Bien qu'un défaut de l'activité soit à l'origine de la maladie de Niemann-Pick, le rôle de la ASMase dans l'apoptose reste sujet à controverse (Santana *et al.*, 1996 ; Kirschnek *et al.*, 2000). L'implication de la NSMase (forme membranaire notamment) dans l'apoptose semble plus généralement reconnue. Elle a été décrite dans l'apoptose de diverses cellules en réponse à des stimuli aussi variés que des cytokines (TNF- $\alpha$ , FasL et l'Il-1), une privation en facteurs de croissance (Mathias *et al.*, 1998) ou encore des drogues cytotoxiques (Bezombes *et al.*, 2001). La régulation de l'activation des SMases, majoritairement observée lors de la stimulation d'un récepteur de mort par son ligand, est sous le contrôle de facteurs variés, qui semblent être spécifiques de la forme enzymatique impliquée. Certains de ces récepteurs possèdent un domaine intracellulaire impliqué spécifiquement dans l'activation des SMases (Wiegmann *et al.*, 1994). L'activation de la ASMase nécessite la formation d'un complexe protéique constitué des protéines adaptatrices FADD et TRADD (Wiegmann *et al.*, 1999), recrutées au niveau du domaine DD du récepteur, et de caspases initiateuses (Brenner *et al.*, 1998 ; Schwandner *et al.*, 1998). L'activation de la NSMase dépend d'une région peptidique nommée NSD (*Neutral sphingomyelinase activation domain*). Au niveau de ce domaine NSD est recruté spécifiquement une protéine adaptatrice, nommée FAN (*Factor associated with NSMase*), capable d'activer directement la NSMase (Adam-Klages *et al.*, 1996). D'autres molécules régulent l'activité des SMases comme (i) des dérivés lipidiques tels le diacylglycérol et l'acide arachidonique (Kolesnick, 1987 ; Jayadev *et al.*, 1997), (ii) des molécules redox tel le glutathion (Liu et Hannun, 1997) et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Goldkorn *et al.*, 1998 ; Singh *et al.*, 1998) ou (iii) par des PKC (Mansat *et al.*, 1997).



**Figure 14. Voies de biosynthèse des céramides et actions directes ou indirectes des céramides dans l'apoptose (non exhaustif).**

Les céramides sont générées soit par la voie *de novo*, soit par le recyclage de la SM. Les céramides peuvent agir indirectement sur l'apoptose via la formation de cavéoles ou de radeaux lipidiques. Plusieurs actions directes sur des protéines de l'apoptose ont été rapportées (faire référence au texte pour plus de détails). En orange sont indiqués différents inhibiteurs pharmacologiques de la synthèse des céramides utilisés dans la première étude de ce travail (voir partie résultats, chapitre I, pp.36-48).

### II.4.4.3. Rôles des céramides dans l'apoptose

#### II.4.4.3.1 Rôle apoptotique indirect : formation des radeaux lipidiques ou cavéoles

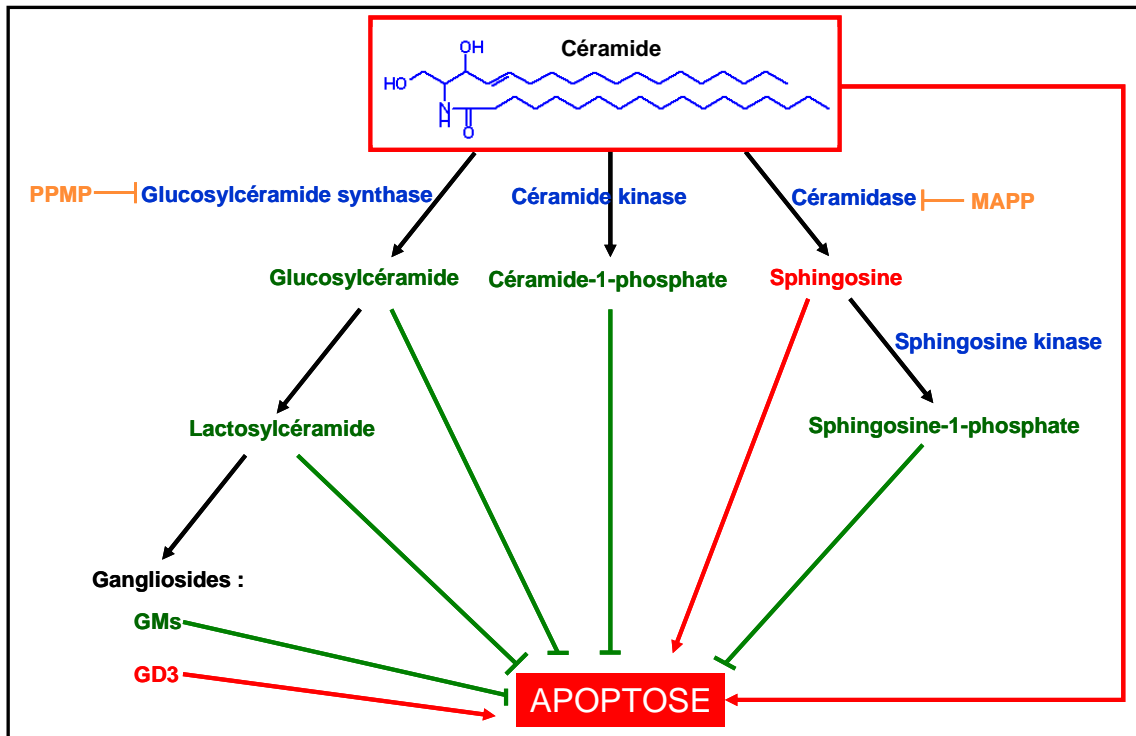
Comme le schématise la figure 14, il a été montré que les céramides s'accumulent au niveau de la membrane cytoplasmique et participent notamment à la formation des micro-domaines de signalisation associés à la cavéoline, les cavéoles (Liu et Anderson, 1995), ou non associés à la cavéoline, les radeaux lipidiques (Dobrowsky, 2000 ; Gulbins et Kolesnick, 2003). Ces micro-domaines sont impliqués dans la transduction de signaux dont celui de l'apoptose, en favorisant l'assemblage des sous-unités des récepteurs trimériques du TNF- $\alpha$ , du FasL, de CD40L et d'autres protéines de signalisation (Ko *et al.*, 1998 ; Brown et London, 2000 ; Zundel *et al.*, 2000).

#### II.4.4.3.2. Rôle apoptotique direct : messagers secondaires

D'une façon générale, les céramides peuvent transmettre un signal de mort par action directe sur des enzymes spécifiques : les CAPK (*Ceramide activated protein kinase*) (Mathias *et al.*, 1991) et les CAPP (*Ceramide activated protein phosphatase*) (Dobrowsky *et al.*, 1993). Une fois activées par les céramides, ces enzymes transmettent le signal de mort selon 2 voies distinctes : la voie d'activation des protéines kinases du facteur de transcription c-jun, (Sawai *et al.*, 1995 ; Xia *et al.*, 1995 ; Verheij *et al.*, 1996) ou via un mécanisme mettant en jeu les protéines Bcl-2 et la mitochondrie. En effet, au cours du processus apoptotique, l'accumulation intracellulaire de céramides est souvent associée à une altération mitochondriale, caractérisée par l'effondrement du  $\Delta\Psi_m$ , la génération de FRO et la libération de facteurs pro-apoptotiques (cytochrome c, AIF, *etc*) via l'établissement de la MPT. Il a été montré notamment que les céramides accumulées dans le cytoplasme, via l'activation de CAPP, peuvent inhiber l'activité de la PKB/Akt et permettre à la protéine Bad de se relocaliser au niveau de la membrane mitochondriale et d'établir la MPT (Zundel et Giaccia, 1998 ; Salinas *et al.*, 2000 ; Zundel *et al.*, 2000). D'autres études suggèrent que les céramides peuvent avoir une action directe sur les mitochondries (Garcia-Ruiz *et al.*, 1997). Les céramides peuvent être générées à partir de SM mitochondriale. Les céramides mitochondriales ont été décrites pour induire la libération du cytochrome c en régulant l'activité des protéines de la famille Bcl-2 notamment en inhibant l'activité de Bcl-2 via l'activation d'une CAPP mitochondriale, la PP2A (Ruvolo *et al.*, 1999), et l'inhibition de la phosphorylation de Bcl-2 par la PKC $\alpha$  (Lee *et al.*, 1996 ; Ruvolo *et al.*, 1998). L'accumulation de céramides au niveau de la membrane mitochondriale peut aussi mener au découplage des complexes de la chaîne respiratoire menant à la formation de FRO (Garcia-Ruiz *et al.*, 1997). La figure 14 résume de façon non-exhaustive les différents modes d'action pro-apoptotique des céramides.

### II.4.4.4 Les céramides et leurs métabolites: équilibre entre survie et mort cellulaire

Les métabolites issus des céramides peuvent être impliqués dans des phénomènes de survie ou de mort cellulaire. Les niveaux intracellulaires de céramides résultent d'un équilibre dynamique entre leur formation et leur métabolisme par divers enzymes : les céramidases couplées à la sphingosine kinase, la glucosylcéramide synthase et la SM synthase. La régulation de l'activité de ces enzymes a pour conséquence directe de moduler les niveaux endogènes en céramides, mais également de générer des lipides mitogéniques aux effets antagonistes à celui des céramides.



**Figure 15. Les céramides et leurs métabolites : équilibre entre survie et mort cellulaire.**  
 Les concentrations relatives endogènes en céramides et en ses métabolites jouent un rôle de rhéostat dans la détermination du devenir cellulaire. En vert sont représentés les composés anti-apoptotiques, en rouge les pro-apoptotiques, en bleu certains enzymes. En orange, MAPP et PPMP, sont deux inhibiteurs pharmacologiques utilisés dans la première étude de ce travail (voir partie résultats, chapitre I, pp. 36-48).

Comme le schématise la figure 15, les céramides peuvent être catabolisés en sphingosine (par une céramidase) puis en S1P (par une sphingosine kinase). L'équilibre entre les taux intracellulaires de céramides et de S1P joue un rôle de rhéostat dans la détermination du devenir cellulaire (Taha *et al.*, 2006). En effet, la S1P exerce un effet mitogénique et anti-apoptotique, en agissant soit par l'intermédiaire de récepteurs membranaires couplés aux protéines G selon un mode autocrine (Pyne, 2002 ; Pyne et Pyne, 2002), soit au niveau intracellulaire en activant notamment la voie de signalisation des MAPK (Coroneos *et al.*, 1995 ; Cuvillier *et al.*, 1996 ; Auge *et al.*, 1998). La synthèse de S1P peut également contrer directement l'effet apoptogène des céramides en inhibant la libération mitochondriale de cytochrome c et de Smac (Cuvillier et Levade, 2001) et l'activation consécutive des caspases effectrices (Cuvillier *et al.*, 1998). Les céramides peuvent également être reconverties en SM sous l'action d'une SM synthase (Ullman et Radin, 1974). Cette réaction s'accompagne de la formation de diacylglycerol (DAG), un puissant agent mitogénique. Enfin, les céramides peuvent être glycosylées dans l'appareil de Golgi pour former séquentiellement les glucosylcéramides (GCer) sous l'action de la glucosylcéramide synthase puis les lactosylcéramides (LCer) sous l'action de la lactosylcéramide synthase. Certaines études ont montré que l'accumulation des céramides est potentialisée par une baisse parallèle de l'activité de la glucosylcéramide synthase (Bourteele *et al.*, 1998 ; Tepper *et al.*, 2000 ; Turzanski *et al.*, 2005), freinant ainsi leur conversion en GCer. Inversement, l'activation de la glucosylcéramide synthase a été impliquée dans certains mécanismes de protection contre l'apoptose, notamment dans la résistance aux drogues cytotoxiques. Les GCer peuvent également induire la prolifération cellulaire en servant de précurseur pour la synthèse de LCer, glycosphingolipides (GSL) capables d'activer une cascade de kinases intégrant les enzymes Ras, Raf et p44 MAPK et menant à l'expression du proto-oncogène c-fos (Bhunia *et al.*, 1996). A partir des LCer peuvent être formés des gangliosides dont la plupart sont connus pour leur rôle anti-inflammatoire et anti-apoptotique (Bleicher et Cabot, 2002 ; Bektas et Spiegel, 2004)

D'autres métabolites sont par contre pro-apoptotiques. Par exemple, la sphingosine est capable d'orienter la cellule vers l'apoptose en activant, par exemple, la voie des JNK (*c-jun-terminal kinases*) ou SAPK (*Stress-activated protein kinases*) ou en inhibant la voie mitogénique des MAPK (Westwick *et al.*, 1995 ; Coroneos *et al.*, 1996 ; Verheij *et al.*, 1996 ; Shen *et al.*, 2003). Des études ont montré que certains GSL, comme les gangliosides D3 (GD3), peuvent être impliqués dans le processus apoptotique (Malisan et Testi, 2002). En effet ce composé est capable de s'accumuler à la surface des mitochondries et d'activer le processus d'apoptose dépendant des mitochondries (De Maria *et al.*, 1997 ; Garcia-Ruiz *et al.*, 1997 ; Rippo *et al.*, 2000).