

Dixièmes journées nationales de la FFER (Deauville, 5–7 octobre 2005)

## L'apoptose : bases fondamentales et applications médicales

### Apoptosis: basic knowledge and applications

P. Marchetti

Inserm U459, 1, place Verdun, 59045 Lille cedex, France

Reçu le 18 mai 2005 ; accepté le 13 juin 2005

Disponible sur internet le 29 août 2005

#### Résumé

L'apoptose est devenue un concept biologique très populaire. La raison principale vient de la découverte que des anomalies de ce processus sont impliquées dans la physiopathologie de nombreuses maladies. Cet article résume les connaissances actuelles sur les mécanismes apoptotiques dans le but de fournir les bases rationnelles pour comprendre leurs dysfonctions et la possibilité de les manipuler à des fins thérapeutiques.

© 2005 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

#### Abstract

Apoptosis has become a most popular concept of cell death. What makes apoptosis particularly exciting for medicine is that its dysfunctions play a central role in the pathogenesis of several human diseases. This review summarizes the considerable knowledge about the cell death pathways. The purpose of this article is to provide a background of relevance to clinicians on apoptosis, and the rationale for future therapeutic interventions directed toward the apoptotic machinery.

© 2005 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

*Mots clés* : Apoptose ; Mort cellulaire programmée ; Mitochondrie ; Caspases

*Keywords* : Apoptosis; Programmed cell death; Mitochondria; Caspases

Le terme « apoptose » a été introduit pour la première fois par Kerr, Wyllie et Curie en 1972 [1]. Par ce terme, signifiant en grec « la chute des feuilles » en automne, un type de mort cellulaire différente de la nécrose, seule forme de mort cellulaire caractérisée jusqu'alors, fut décrit. En réalité, au moment où le mot est introduit, l'apoptose était déjà connue mais faisait l'objet de descriptions disparates (nécrose acidophile ou corps de Councilman pour les anatomopathologistes) et était plutôt considérée comme une curiosité morphologique inexpiquée. Il revient ensuite à Wyllie d'avoir montré dès 1980 que la condensation de la chromatine observée au cours du processus apoptotique avait une traduction biochimique particulière, caractérisée par la fragmentation régulière de l'ADN en oligonucléosomes et en nucléosomes, objectivée

sur gel d'agarose sous forme de barreaux d'échelles [2]. Malgré l'importance de ces travaux, l'apoptose n'a acquis droit de cité que lorsque les scientifiques ont compris que celle-ci était un phénomène actif génétiquement programmé. Cette découverte essentielle a été appuyée par les travaux d'Horvitz et de son équipe [3] lors de l'étude de l'embryogenèse du nématode *Caenorhabditis elegans* qui présente la particularité, au cours de son développement, de voir mourir par apoptose un nombre restreint et constant de cellules. L'analyse des facteurs intervenant dans cette mort naturelle a ainsi permis d'individualiser toute une série de gènes contrôlant l'ensemble des étapes de l'apoptose. Parmi ceux-ci, les gènes *egl-1*, *ced-3* et *ced-4* dont l'expression favorise le programme de mort cellulaire alors que *ced-9* l'inhibe. De même, au cours du développement embryonnaire des vertébrés, l'expression programmée de gènes spécifiques de mort à un

Adresse e-mail : [philippe.marchetti@lille.inserm.fr](mailto:philippe.marchetti@lille.inserm.fr) (P. Marchetti).

moment donné, dans un lieu donné de l'organisme, est responsable des bouleversements phénotypiques qui contribuent à la sculpture du soi. Parallèlement à ces travaux, une autre équipe a individualisé en 1984, à partir du point de cassure de la translocation t(14 ;18) retrouvé dans certains lymphomes humains à cellules B, un gène appelé *bcl-2* (*B-cell lymphoma*), qui une fois transfecté dans des cellules hématopoïétiques, prolonge de façon significative la survie de ces cellules et cela non pas en favorisant la prolifération, mais en bloquant l'apoptose (pour revue [4]). L'étude des effets de la transfection du gène humain *bcl-2* chez *C. elegans* ainsi que la démonstration de l'étroite analogie entre *bcl-2* et *ced-9* a établi la haute conservation du programme de mort entre les espèces [5]. Cela a été corroboré par la découverte que le gène *ced-3* codait une protéine homologue de l'enzyme de conversion de l'IL1- $\beta$  (ICE pour *Interleukine Converting Enzyme*) humaine prototype d'une famille de protéases appelées caspases [6]. D'abord décrites pour leur rôle pro-inflammatoire, les caspases ont ensuite été suspectées de participer au processus apoptotique du fait de leur homologie de structure avec CED-3. Un pas déterminant fut franchi lorsque des anomalies quantitatives de l'apoptose, par excès ou par défaut, furent décrites dans des pathologies aussi diverses que le sida ou les cancers. Ces découvertes ont alors donné à l'apoptose une dimension nouvelle et rapidement fascinante. Non seulement l'apoptose représente au cours du développement une fonction cellulaire physiologique programmée, mais elle occupe également dans la cellule adulte une place aussi importante que la différenciation ou le cycle cellulaire. À partir de 1990, les travaux sur l'apoptose ont augmenté de façon exponentielle et des centaines de publications consacrées à la mort cellulaire apoptotique paraissent chaque mois. Enfin, la reconnaissance d'un rôle majeur du processus apoptotique en physiologie comme en médecine est illustrée par la remise en décembre 2002 du prix Nobel à trois chercheurs, Brenner, Sulston et Horvitz, pour leur découverte, extrapolable aux organismes supérieurs, des gènes régulateurs de l'apoptose chez *C. elegans*. Ainsi, du laboratoire de recherche où ce processus a été caractérisé, l'apoptose est en passe de présenter également un véritable enjeu médical, en particulier depuis l'apparition et le développement de nouvelles techniques de détection utilisables chez l'Homme, ainsi que de nouveaux médicaments capables de la moduler.

Cette revue s'inscrit dans cette évolution en proposant une mise au point sur l'état actuel des connaissances et en abordant quelques interrogations nouvelles soulevées par l'étude de l'apoptose dans un contexte pathologique.

## 1. Précisions sur la définition de l'apoptose

### 1.1. Apoptose et mort cellulaire programmée

À l'origine, l'apoptose est un terme anatomopathologique qui désigne les perturbations morphologiques et biochimiques associées au déroulement d'un programme cellulaire de

mort. En effet, les altérations de l'ultrastructure nucléaire sont les plus marquantes (condensation de la chromatine en mottes compactes, puis diminution du volume nucléaire, et destruction par fragmentation du noyau) tandis que les anomalies cytoplasmiques passent au deuxième plan. L'ultrastructure des organelles est globalement préservée et la membrane plasmique reste imperméable, jusqu'à la fin du processus de dégradation. D'un point de vue biochimique, outre la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN, d'autres altérations apoptotiques, de découvertes plus récentes, sont généralement observées (voir ci-dessous). Malgré tout, l'apoptose n'est pas stricto sensu synonyme de mort cellulaire programmée. D'une part, le fait que l'on peut expérimentalement induire l'apoptose dans des cellules anucléées indique que l'apoptose peut survenir sans la transcription spécifique de gènes de mort. D'autre part, de nombreuses données récentes montrent qu'il existe d'autres programmes de mort que la mort apoptotique comme par exemple le suicide cellulaire par autophagie [7].

### 1.2. Apoptose et nécrose : différents visages de la mort cellulaire

L'apoptose est également définie par rapport à un autre type de mort cellulaire appelé nécrose. Une caractéristique fondamentale de l'apoptose est la transformation ultime de la cellule en corps apoptotiques, structures minicellulaires qui contiennent organites, fragments de noyaux et de cytosol entourés d'une membrane plasmique ne présentant pas de troubles majeurs de la perméabilité. Ces corps apoptotiques qui exposent à leur surface des résidus phosphatidylsérines, seront ensuite reconnus et ingérés par les macrophages ou les cellules avoisinantes sans déclencher de réaction inflammatoire. À l'inverse, la mort nécrotique qui survient lorsque les cellules sont sévèrement endommagées par un stimulus accidentel conduit à un gonflement suivi de rupture de la membrane cellulaire permettant le déversement du contenu intracellulaire dans l'espace interstitiel engendrant in fine une réaction inflammatoire intense. C'est pourquoi la mort nécrotique est décrite comme une mort bruyante par opposition à la mort apoptotique dite silencieuse qui, de ce fait, a longtemps été ignorée. En dépit de ces différences fondamentales, des travaux récents remettent en cause la vision réductrice de la dichotomie entre apoptose et nécrose et révèlent qu'apoptose et nécrose pourraient partager une ou plusieurs voies biochimiques communes [8]. Il est en effet de plus en plus évident que certains types de mort cellulaire précédemment décrits comme impliquant une nécrose primaire, tels que l'infarctus du myocarde, la congestion cérébrale ou la mort induite par des pro-oxydants, sont en fait des situations où les phénomènes apoptotiques et nécrotiques coexistent. De plus, les altérations fonctionnelles mitochondriales sont rencontrées à la fois lors de l'apoptose et lors de la nécrose et la surexpression du produit du gène *bcl-2* peut inhiber aussi bien l'apoptose que la nécrose [9]. Dès lors, on peut concevoir l'apoptose et la nécrose représentant les visages extrêmes

mes et opposés d'un unique processus de mort cellulaire – la progression vers l'un ou l'autre type de mort dépendant de facteurs environnementaux (intensité du stimulus initial de mort), et/ou cellulaires (quantité d'ATP, activation de caspases). Entre ces deux représentations opposées de la mort, il pourrait exister une multitude de types de mort, appelée nécroptose, paraptose, abortose, partageant, à des degrés divers, certaines caractéristiques apoptotiques et nécrotiques [10]. L'émergence d'une multiplicité des visages de la mort cellulaire devrait désormais être prise en compte lors du développement de traitements ciblant les mécanismes de la mort cellulaire.

## 2. La mise en place des éléments du puzzle apoptotique (Fig. 1)

Jusqu'au milieu des années 1990, par analogie avec les données obtenues chez *C. elegans*, il était généralement admis, que les cellules recevant un signal de mort ou l'absence de signal de survie déclenchaient un programme génétique de mort avec activation de gènes spécifiques ou *killer genes*. Dans ce scénario, l'apoptose était avant tout une affaire nucléaire, de l'initiation des gènes à la dégradation finale de l'ADN. Au fur et à mesure de l'avancée des connaissances, de cette vision purement nucléocentrique, l'apoptose est deve-

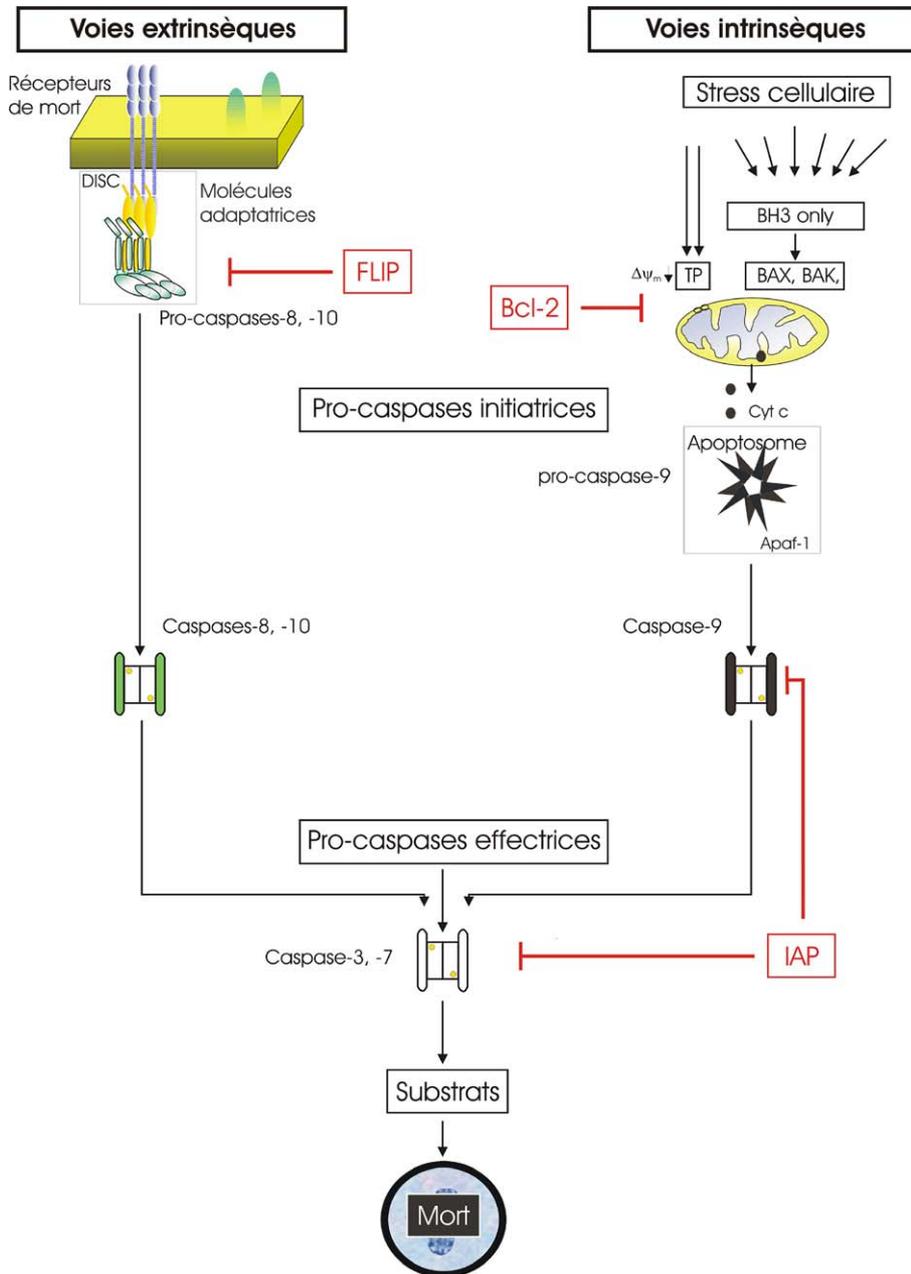


Fig. 1. Le puzzle apoptotique : représentation simplifiée des voies apoptotiques extrinsèques et intrinsèques qui conduisent à la mort de la cellule. (Voir texte pour détail.).

nue un processus aboutissant à la fragmentation nucléaire étroitement contrôlé par de multiples étapes cytoplasmiques en amont. Ce sont ces événements qui sont résumés dans les chapitres suivants et schématisés sur la Fig. 1.

### 2.1. La fragmentation oligonucléosomique de l'ADN résulte de l'activation de procaspases effectrices

Il a fallu plus de 15 ans pour caractériser les mécanismes moléculaires responsables de la fragmentation oligonucléosomique apoptotique. Celle-ci est secondaire à l'effet d'endonucléases appelé CAD/DFF40 (*Caspase-Activated DNase/DNA Fragmentation Factor 40*) dont le mécanisme d'activation est désormais clairement identifié. Dans des cellules non apoptotiques, CAD/DFF40 est présente au sein du cytosol sous forme inactive complexée à son inhibiteur naturel ICAD/DFF45 (*Inhibitor of Caspase-Activated DNase/DNA Fragmentation Factor 45*). Au cours du processus apoptotique, l'inhibiteur ICAD, est spécifiquement dégradé par un sous-groupe de caspases dites effectrices (voir ci-dessous) permettant alors la libération et la translocation nucléaire de la nucléase CAD active qui pourra ainsi fragmenter l'ADN des cellules apoptotiques [11].

Les caspases sont des cystéines protéases qui clivent spécifiquement leur substrat après un motif peptidique contenant un aspartate d'où le terme caspases ou c-Asp-ases pour cystéines Asp protéases [6]. Actuellement, chez les mammifères, 14 membres de la famille des caspases ont été identifiés, dont 12 enzymes humaines sont connues [12]. Comme de nombreuses protéases, les caspases sont exprimées sous une forme zymogénique (proenzyme) inactive qui contient trois domaines séparés par des résidus aspartates, sites de clivage potentiel par les caspases elles-mêmes. Les caspases, une fois activées, reconnaissent sur leur substrat cible un motif térapeptidique se terminant par le résidu aspartate définissant le site de clivage. Les caspases effectrices, (caspases-3, -7, -6), sont appelées ainsi car elles participent activement à la destruction de la cellule apoptotique en clivant spécifiquement différents substrats cytosoliques et nucléaires. C'est pourquoi les caspases effectrices sont comparées à des ciseaux capables de découper la cellule. Outre la protéine ICAD, plus de 100 protéines substrats des caspases effectrices ont été décrites lors de l'apoptose [13]. Une enzyme de réparation nucléaire, la PARP (*Poly-ADP Ribose Polymerase*), est la cible majeure du clivage protéolytique par les caspases effectrices qui l'inactivent. Citons également le clivage par les caspases de structures de l'architecture des cellules comme l'actine, la gelsoline ou certaines lamines nucléaires. Enfin, les caspases peuvent inactiver par clivage certaines protéines antiapoptotiques (comme Bcl-2) contribuant ainsi à précipiter irréversiblement la cellule vers la mort.

Les caspases sont régulées naturellement par des protéines de la famille des IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) (pour revue [14]). D'abord découvertes chez les baculovirus, il en existe au moins huit chez les mammifères. Les IAPs empêcheraient les conséquences de l'activation accidentelle

ou spontanée des caspases en établissant un seuil à partir duquel les caspases peuvent dégrader la cellule. L'inhibition de l'apoptose par les IAPs (par exemple les protéines XIAP, cIAP-1, -2) survient le plus souvent par inhibition directe des caspases conduisant à la dégradation du complexe ainsi formé. Les IAPs peuvent également exercer leur fonction anti-apoptotique de manière indépendante de l'inhibition des caspases en augmentant les voies de survie cellulaire.

### 2.2. La cascade d'activation des caspases : les procaspases effectrices sont activées par des caspases initiateuses

De manière générale, la maturation des procaspases pour obtenir des caspases actives pleinement fonctionnelles se fait par clivage protéolytique au niveau des résidus aspartates qui délimitent les trois domaines [12]. Les caspases effectrices sont activées de manière hiérarchique, en cascade, par d'autres caspases appelées caspases initiateuses (caspases-2, -8, -9, -10) (pour revue [6,15]). Ainsi, le clivage protéolytique de la procaspase-3 survient sous l'effet direct des caspases-8 ou -9 activées. Plus rarement, l'activation protéolytique des caspases effectrices peut être secondaire à l'action d'autres protéases comme les granzymes B ou les cathepsines.

### 2.3. Les procaspases initiateuses sont capables de s'autoactiver

Les procaspases initiateuses sont caractérisées par la présence d'un long prodomaine (> 10 Kda) possédant des motifs peptidiques impliqués dans des interactions avec d'autres protéines possédant ces domaines d'homologie. Ces interactions protéines-protéines ont pour conséquence le recrutement et l'agrégation sur un même site d'un nombre suffisant de procaspases initiateuses capables de déclencher leur auto-activation. Ainsi, à l'origine de la réponse apoptotique réside l'autoactivation des procaspases initiateuses. C'est par exemple le cas de l'activation des procaspases-8 (ou des procaspases-10) lors de l'activation des récepteurs de mort (voir ci-dessous). Récemment, un complexe multimoléculaire responsable de l'agrégation et de l'activation de la caspase-2 appelé PIDDOSOME a également été décrit dans l'apoptose induite par les génotoxiques [16].

### 2.4. L'autoactivation des caspases initiateuses est secondaire à l'engagement des voies apoptotiques extrinsèques et intrinsèques

La nature des caspases initiateuses activées est déterminée par l'engagement de voies apoptotiques spécifiques. On distingue ainsi une voie intrinsèque mitochondriale conduisant à l'activation de la procaspase-9 d'une part, et d'autre part, une voie extrinsèque dépendante des récepteurs de mort conduisant à l'activation des caspases-8 et -10.

#### 2.4.1. Voie apoptotique intrinsèque

Les procaspases-9 s'autoactivent après agrégation au sein d'un complexe cytosolique multimoléculaire appelé apopto-

some [15]. Le cœur de la structure de l'apoptosome est une protéine cytoplasmique, Apaf-1, homologue humain de CED-4, qui change de conformation après interaction avec le cytochrome c en présence d'ATP ou de dATP. Ce changement conformationnel permet aux oligomères d'Apaf-1 de recruter et d'autoactiver la procaspase-9. La formation de l'apoptosome est secondaire à la libération du cytochrome c, normalement situé dans l'espace intermembranaire mitochondrial, vers le cytosol. Celle-ci est déclenchée par une perméabilisation accrue de la membrane mitochondriale externe (MME), phénomène modulé par les membres de la famille de Bcl-2. Sur la base de caractéristiques fonctionnelles et structurales, la famille de Bcl-2 est habituellement divisée en trois sous-groupes (pour revue [17,18]). Le premier regroupe les protéines antiapoptotiques comme Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, qui possèdent les régions d'homologie BH1, BH2, BH3 ou BH4. Le second regroupe les protéines proapoptotiques comme Bax, Bak, Bok, et Bcl-Rambo caractérisées par la présence de plusieurs régions d'homologie BH1, 2 et 3, à l'exception notable de BH4. Enfin, le dernier sous-groupe appelé le groupe des protéines *BH3-only* est constitué d'un nombre croissant de protéines comme Bad, Bid et Bik, Bim, Hrk, Noxa, Puma, Bmf, Bcl-G etc. Composées d'une unique région d'homologie BH3, ces protéines contribuent à l'activité proapoptotique de Bax et/ou de Bak en favorisant leur oligomérisation.

Il existe actuellement au moins deux mécanismes pouvant expliquer la perméabilisation de la MME lors de l'apoptose. Le premier, observé lors de l'apoptose comme de la nécrose, implique un phénomène appelé transition de perméabilité (TP) et s'accompagne d'anomalies fonctionnelles mitochondriales telles qu'une réduction du potentiel de membrane mitochondrial, un découplage de la chaîne respiratoire et la production d'anions superoxydes. Il s'agit de l'ouverture d'un mégacanal mitochondrial ou pore de TP situé aux points de contacts entre les membranes mitochondriales externes et internes [19]. L'ouverture du pore de TP est régulée par la famille de Bcl-2. Ainsi, la protéine proapoptotique Bax est capable de favoriser la TP [20] tandis que Bcl-2 prévient l'ouverture du pore. Ce modèle de perméabilisation de la membrane externe est particulièrement pertinent dans l'apoptose induite par ischémie–reperfusion ou en réponse à un stress cellulaire inducteur de seconds messagers comme le calcium, la production d'espèces réactives de l'oxygène, de céramides ou du monoxyde d'azote capables d'ouvrir le pore de TP.

La perméabilisation de la MME peut s'expliquer par un second mécanisme qui implique directement les membres de la famille de Bcl-2. Lors d'un stimulus apoptotique, les protéines proapoptotiques telles que Bax et/ou Bak sont relocalisées au niveau de la MME pour former un canal capable de libérer le cytochrome c. Ce processus est régulé par les autres membres de la famille de Bcl-2. D'une part, la séquestration des protéines pro-apoptotiques par les protéines anti-apoptotiques empêche celles-ci de perméabiliser la mitochondrie [21]. D'autre part, l'activation de Bax et/ou de Bak peut

être favorisée par la synthèse et/ou la translocation mitochondriale des protéines *BH3-only* (consécutives à différents stress cellulaires et notamment au sevrage en facteurs de croissance) considérées comme de véritables émissaires de mort [22]. En conséquence, le ratio entre les protéines anti- et proapoptotiques de la famille de Bcl-2 a été décrit comme le rhéostat de la vie et de la mort cellulaire.

#### 2.4.2. Voie apoptotique extrinsèque

L'activation des voies apoptotiques extrinsèques nécessite l'intervention des récepteurs de mort (ou DR pour *Death Receptor*) de la superfamille du récepteur du TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*) (pour revue [23]). La famille des TNF-R est une famille de plus de 20 membres parmi lesquels les récepteurs de mort (DR1 à DR5) partagent des séquences d'homologie dans leur domaine intracytoplasmique responsables de la signalisation apoptotique. Parmi les récepteurs de mort, Fas (DR2) et TNF-R1 (DR1) sont les récepteurs qui ont été les plus étudiés. Les récepteurs Fas (DR2) sont exprimés par la majorité des types cellulaires. Après fixation à leur ligand, ces récepteurs déclenchent une succession d'événements moléculaires qui :

- conduisent à l'oligomérisation des récepteurs transmembranaires ;
- suivie du recrutement de protéines adaptatrices cytoplasmiques (FADD pour *Fas-Associated Death Domain* et/ou TRADD pour *TNR Receptor Associated Death Domain*) ;
- qui à leur tour vont recruter les procaspases initiatrices -8 et -10 (pour revue [23]).

Cet ensemble multiprotéique impliquant ligands–récepteurs protéines adaptatrices et procaspases initiatrices porte le nom de DISC (pour *Death-Inducing Signaling Complex*). Il s'ensuit l'activation autocatalytique des caspases initiatrices qui précipite la cellule vers une mort inéluctable (voir ci-dessus). Cependant, la mort cellulaire induite par les récepteurs de mort peut être régulée au niveau des caspases initiatrices les plus en amont du processus apoptotique par les molécules FLIP (*FLICE-Inhibitory Proteins*). Ces protéines ont la capacité de rentrer en compétition avec les procaspases initiatrices. Ces protéines sont alors recrutées, à la place de procaspases initiatrices, au niveau du DISC entraînant consécutivement une absence d'autoactivation des procaspases et l'arrêt de la propagation du signal en aval.

### 3. Vers un niveau supérieur de complexité

Plusieurs données expérimentales ne s'accordent pas avec la description précédente des voies apoptotiques suggérant l'existence d'autres relais plus complexes (Fig. 2).

#### 3.1. D'autres facteurs mitochondriaux pro-apoptotiques libérés par la mitochondrie sont nécessaires au déroulement de l'apoptose

En effet, la libération de cytochrome c *per se* peut s'avérer insuffisante pour induire l'apoptose du fait d'un blocage des

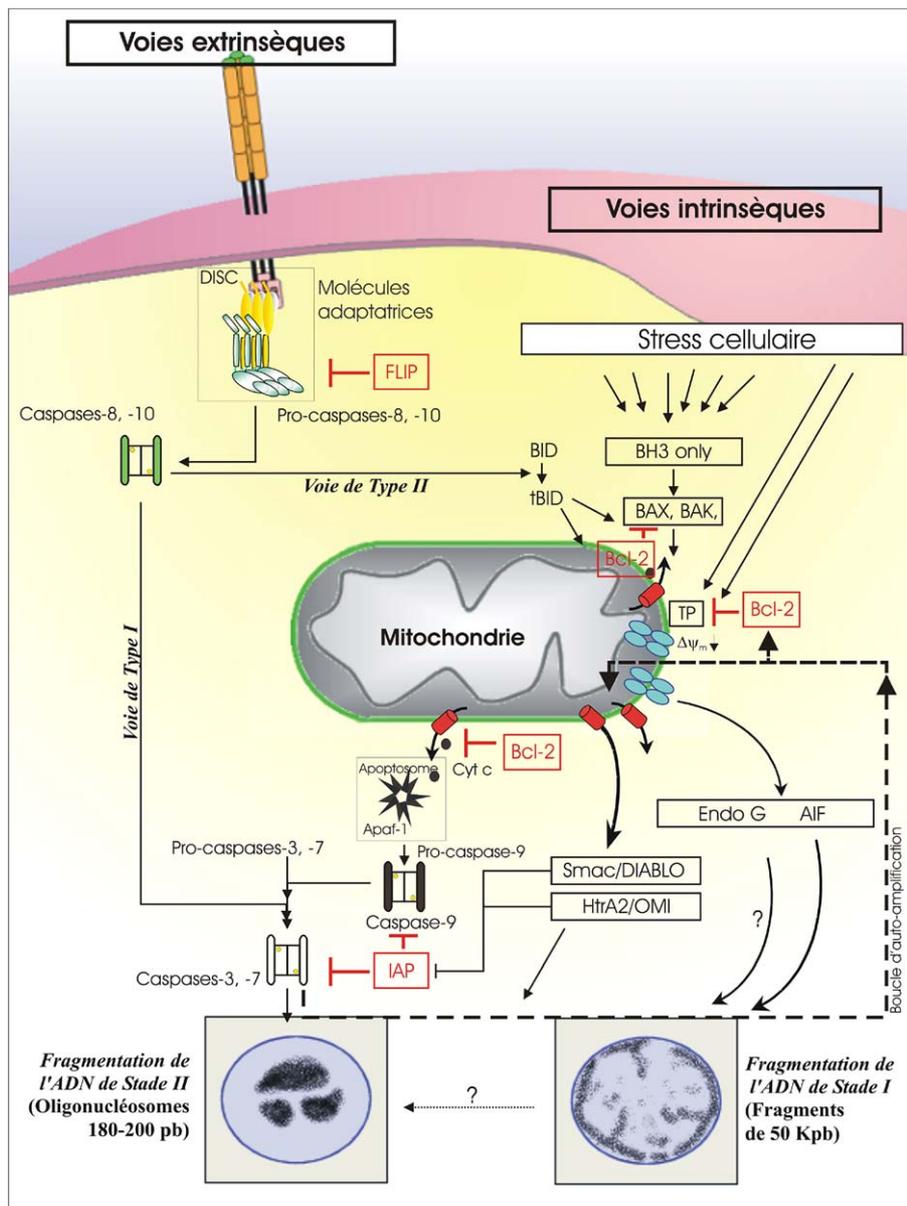


Fig. 2. Complexité des voies apoptotiques.

Sur cette représentation schématique, sont mentionnés (i) la communication entre les voies extrinsèques et intrinsèques, (ii) les principaux facteurs mitochondriaux proapoptiques libérés par la mitochondrie, (iii) les voies indépendantes des caspases, (iv) une boucle d'autoamplification rétroactive des caspases effectrices vers la mitochondrie (voir texte pour détail). À noter la place centrale des mitochondries capables d'intégrer les signaux proapoptiques en amont, de les réguler et d'amplifier l'activation mortelle des caspases.

caspases en aval par l'expression soutenue des IAPs. L'existence d'un second facteur mitochondrial activateur d'apoptose libéré par la mitochondrie est ainsi nécessaire pour tuer la cellule. C'est le cas de la protéine mitochondriale appelée Smac (*Second mitochondrial activator of caspases*) ou DIABLO (*Direct IAP Binding protein with Low pI*) qui est capable dans le cytosol de lever l'inhibition des caspases en neutralisant les IAPs après interaction directe [24]. De la même manière que Smac/DIABLO, le facteur mitochondrial Omi/HtrA2, est capable d'augmenter l'activité des caspases en se liant aux IAPs [25,26]. D'autres facteurs libérés par la mitochondrie lors de l'apoptose ont été décrits (Tableau 1) mais à ce jour leurs rôles restent mal compris [27].

### 3.2. Les voies extrinsèques et intrinsèques communiquent

Le fait que l'apoptose induite par le récepteur Fas puisse être inhibée par la surexpression de Bcl-2 suggère l'existence d'une voie extrinsèque possédant un relais mitochondrial. En effet, après l'engagement des récepteurs, l'activation de la caspase-8 peut, dans certaines cellules, cliver une protéine du groupe *BH3-only* appelée Bid, qui va alors s'insérer dans la MME [28]. Les protéines Bax ou Bak sont ensuite activées pour permettre la perméabilisation de la MME. Cette voie déclenchée par les récepteurs de mort appelée voie de type II en opposition à la voie extrinsèque classique indépendante des mitochondries dite de type I, survient dans certains

Tableau 1  
Caractéristiques fonctionnelles des protéines mitochondriales libérées lors de l'apoptose

Protéines	Fonction dans l'espace intermembranaire mitochondrial	Fonction après libération mitochondriale
Cytochrome c	Navette entre complexes III et IV de la chaîne respiratoire	Activation cytosolique de l'apoptosome—voie dépendante des caspases
AIF	Flavoprotéines (activité NADH oxydase)	Dégradation nucléaire indépendante des caspases (fragments de 50 kpb)
AMID	Flavoprotéine homologue d'AIF	n.d.
Endonucléase G		Dégradation nucléaire indépendante des caspases
Smac/DIABLO	n.d.	Inhibiteurs des IAP
HtrA2/OMI	n.d.	Inhibiteurs d'XIAP, sérine protéase
ARTS <sup>a</sup>	n.d.	Inhibiteur d'XIAP
Procaspases -2, -3, -8, -9	n.d.	Voie dépendante des caspases
Hsp 60, 10	chaperonne	Maturation des caspases ?
Adénylate kinase 2, Sulfite oxydase, Acyl-CoA binding protein, Fatty-acid binding protein 1, polypyrimidine tract-binding protein	métaboliques	n.d.

n.d. : non déterminé

<sup>a</sup> appartient à la famille des septines.

types cellulaires lorsque l'expression des IAPs empêche l'activation directe de la cascade des caspases. Dans ces conditions, la voie de type II permet la mort non pas par libération mitochondriale de cytochrome c mais par la libération d'inhibiteurs des IAPs comme Smac/DIABLO.

### 3.3. Le phénotype apoptotique ne se résume pas à l'action des caspases

Plusieurs constatations indiquent un rôle grandissant de facteurs indépendants des caspases :

- certaines manifestations apoptotiques sont indépendantes des caspases. C'est le cas du rétrécissement cellulaire, de la condensation nucléaire périphérique [29] ;
- certains modèles d'apoptose surviennent sans activation des caspases ;
- enfin, l'inhibition des caspases *in vitro*, bien qu'empêchant l'apparition du phénotype apoptotique n'est pas capable d'éviter la mort cellulaire [8].

Au moins deux effecteurs mitochondriaux indépendants des caspases ont été décrits [27]. Il s'agit de l'AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) et de l'endonucléase G. L'AIF est en fait une oxydoréductase mitochondriale normalement confinée dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Sous l'induction d'un signal apoptotique, l'AIF est transféré dans le noyau où il induit la condensation périphérique de la chromatine et la fragmentation de l'ADN en fragments de grande taille (50 kpb) [29]. L'AIF est indispensable à la première vague de mort cellulaire développementale qui conduit à la formation des corps embryonnaires chez la souris [30]. De plus l'activation de la protéine de réparation PARP-1, induite par ischémie–reperfusion, excitotoxicité et divers processus inflammatoires, provoque la libération d'AIF et tue la cellule de manière indépendante des caspases [31]. Il est à noter que le cytochrome c comme AIF sont donc toutes les deux des protéines bifonctionnelles c'est-à-dire indispensables à la vie et probablement aussi à la mort cellulaire. Pour expliquer le

rôle du cytochrome c et de l'AIF dans l'apoptose, une hypothèse a été émise [32]. L'AIF libéré provoque des altérations nucléaires dites de stade I caractérisées par une condensation nucléaire et une fragmentation de grande taille tandis que les caspases activées après libération de cytochrome c induisent la fragmentation oligonucléosomale (stade II). La contribution respective des voies dépendantes d'AIF et celles dépendantes du cytochrome c peut alors se concevoir de manière séquentielle où les événements nucléaires de stade I pourraient être préparatoires à l'apparition des anomalies de stade II (Fig. 2) [32].

À côté d'AIF, l'endonucléase G, une nucléase spécifique de la mitochondrie, est libérée dans le cytosol pour induire la fragmentation nucléosomale de l'ADN indépendamment des caspases et de DFF40/CAD [33]. Il est possible que les deux facteurs indépendants des caspases puissent agir de concert puisque, chez *C. elegans*, WAH-1, l'homologue d'AIF, s'associe et coopère avec CSP6, l'homologue de l'endonucléase G, pour induire la dégradation de l'ADN et l'apoptose [34]. Cette coopération n'a à ce jour pas été démontrée chez les mammifères.

### 3.4. Existence de boucles d'autoamplification précipitant la cellule vers une mort inéluctable

Nous avons dévoilé le processus apoptotique sur un mode linéaire très hiérarchisé. Néanmoins, il semble exister des voies rétroactives, impliquant un effet des caspases activées à un stade postmitochondrial sur la mitochondrie [35]. Ainsi, après la libération mitochondriale de cytochrome c, l'activation de la caspase-3 provoque, en retour, des dommages fonctionnels mitochondriaux par dégradation du complexe I de la chaîne respiratoire [36]. Ces données suggèrent l'existence de boucles autoamplificatrices (mitochondries ↔ caspases) rendant à partir d'un certain seuil le processus apoptotique irréversiblement engagé dans la phase de dégradation.

#### 4. Irruption de l'apoptose dans la pratique médicale : entre promesses et pièges

Dans les organismes adultes, l'apoptose est un phénomène physiologique indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Ce processus permet de contrôler la taille des populations cellulaires en équilibrant les cellules en mitose ou en différenciation. L'apoptose est, par exemple, nécessaire à la spermatogenèse normale et maintient l'étroite balance entre cellules germinales et cellules de Sertoli. Dans le testicule, l'apoptose contrôle l'expansion clonale excessive des cellules germinales avant les étapes de différenciation aboutissant aux spermatozoïdes matures. On conçoit alors que l'induction inappropriée ou le défaut d'apoptose puisse participer à la pathogénie de nombreuses maladies (Tableau 2) et qu'un dysfonctionnement de ce processus physiologique puisse être également responsable d'infertilité [37,38].

##### 4.1. Les promesses : intérêt thérapeutique et diagnostique

L'ensemble de ces découvertes a permis d'envisager l'apoptose comme une nouvelle cible thérapeutique. Par exemple, la constatation que les cellules tumorales pouvaient mourir par sous-expression de gènes antiapoptotiques comme *bcl-2* ou par surexpression de *bax* a permis le développement de nouveaux agents anticancéreux ciblant la famille de Bcl-2. Des inhibiteurs de caspases sont actuellement en phase II d'essais cliniques dans des pathologies aiguës du foie et dans l'arthrite inflammatoire. À côté de ces applications thérapeutiques, la recherche de marqueurs apoptotiques utilisables chez l'Homme a également été entreprise. L'utilisation d'annexine V marquée au Tc99 m a été utilisée avec succès pour détecter les dommages cellulaires *in vivo* dans la polyarthrite rhumatoïde et l'infarctus du myocarde y compris chez l'Homme [39,40]. L'avenir nous indiquera la place des marqueurs apoptotiques dans l'exploration de ces pathologies.

##### 4.2. Les pièges : trop d'apoptose tue l'apoptose

Au fil des ans, l'apoptose est devenue un concept biologique très populaire et l'utilisation de ce terme en rapport avec de nombreuses pathologies s'est avérée parfois abusive. La raison principale provient d'une absence de consensus dans la définition de l'apoptose. Hormis les considérations méthodologiques, nous envisagerons dans les paragraphes suivants

certain points à garder à l'esprit pour éviter le piège du « tout apoptose ».

##### 4.2.1. Considérations interprétatives : quels critères pour parler d'apoptose ?

Bien que l'apoptose soit clairement définie par des critères morphologiques et biochimiques, une difficulté majeure réside dans le fait qu'aucun signe pris isolément ne permet de conclure assurément au déroulement du processus apoptotique pour au moins deux raisons. Premièrement, les signes classiques d'apoptose ne sont pas toujours présents lors du déroulement de ce processus. Non seulement l'apoptose peut survenir en l'absence de caspases, mais également sans fragmentation oligonucléosomique de l'ADN [41]. Deuxièmement, les signes apoptotiques ne sont pas spécifiques. Outre leur rôle dans l'apoptose, les caspases peuvent être activées lors de l'inflammation mais également lors de la différenciation. C'est le cas des cellules épithéliales du cristallin, des kératinocytes ou des hématies qui perdent leurs noyaux et certains organites pendant la différenciation terminale en restant néanmoins métaboliquement actives. De même, la différenciation terminale des spermatozoïdes s'accompagne de l'activation de caspases du moins chez la drosophile [42]. Dans ce modèle, l'inhibition des caspases conduit à des spermatozoïdes morphologiquement anormaux présentant un cytoplasme résiduel. Dans ce contexte il est troublant de constater que l'activation des caspases a été retrouvée principalement dans les spermatozoïdes humains avec résidus cytoplasmiques [43]. L'externalisation des phosphatidylsérines sur le feuillet externe de la membrane plasmique, détecté par le marquage annexine V, est un signe apoptotique précoce. Cependant des remaniements des lipides membranaires peuvent s'observer en dehors de l'apoptose. Ainsi, la capacitation des spermatozoïdes s'accompagne de l'expression aberrante des aminophospholipides, phosphatidylsérines et phosphatidyléthanolamines, sur le feuillet externe de la membrane plasmique jetant un doute sur la pertinence de l'utilisation de l'annexine V comme marqueur de l'apoptose des spermatozoïdes [44]. Dans le même esprit, il serait dangereusement réducteur de limiter la seule présence d'une chute du potentiel de membrane mitochondrial à un signe pathognomonique de l'apoptose [45]. En conséquence, il nous semble fondamental de définir un profil apoptotique en s'appuyant sur une étude multiparamétrique afin d'éviter des interprétations erronées fondées sur un seul marqueur.

Tableau 2

Exemples de pathologies associées à un excès ou à un défaut d'apoptose

Affections associées à un défaut d'apoptose	Affections associées à un excès d'apoptose
Néoplasmes	Hémopathies (syndromes myélodysplasiques)
- cancers solides (carcinomes avec mutation de la protéine P 53, cancers hormono-dépendants)	Maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, de Parkinson, sclérose latérale amyotrophique)
- hémopathies malignes (leucémies et lymphomes)	Choc septique
Maladies auto-immunes	Pathologie ischémique (infarctus du myocarde - troubles ischémie/reperfusion, ischémie cérébrale)
(Lupus érythémateux disséminé, glomérulonéphrite, polyarthrite rhumatoïde, sclérose en plaques etc.)	Maladies auto-immunes (thyroïdite d'Hashimoto)
Viroses (herpès, Pox et adénovirus)	Virose (VIH)
Tératogénie	Tératogénie

#### 4.2.2. Considérations tissulaires : peut-on extrapoler les connaissances acquises à tous les types cellulaires ?

Les connaissances des voies apoptotiques reposent sur des expériences réalisées principalement sur des lignées cellulaires cancéreuses ou des cellules immunes et il peut être hasardeux de les extrapoler telles quelles à d'autres types cellulaires. Ainsi, il existe des différences manifestes selon les tissus, principalement pour les cellules en différenciation terminale et qui ne possèdent pas ou peu de capacité de renouvellement. Il est clair désormais que dans de nombreuses circonstances pathologiques le processus apoptotique est initié et traduit dans les cardiomyocytes avec libération de cytochrome c, activation de caspases [46,47]. Cependant l'apoptose ne conduit qu'exceptionnellement à des dommages nucléaires. Il est probable que les cellules en différenciation terminale soient résistantes à la fragmentation en dépit de l'activation continue de la cascade apoptotique en amont [48]. C'est pourquoi, dans l'insuffisance cardiaque, ce programme de mort a été appelé « apoptosis interruptus » pour définir un type d'apoptose incomplète des cardiomyocytes [49]. Il est en effet important pour les cardiomyocytes de posséder des stratégies antiapoptotiques puisque ce type cellulaire a perdu ses capacités régénératrices. Les mécanismes régulateurs peuvent être représentés par la surexpression d'inhibiteurs endogènes, l'activation de voies de survie et/ou l'absence d'une molécule essentielle aux voies proapoptotiques. Cette dernière éventualité a en effet été démontrée dans le myocyte squelettique, qui est dépourvu de molécule Apaf-1 et est donc intrinsèquement résistant à l'activation des caspases par la voie dépendante du cytochrome c [50]. Bien que les spermatozoïdes présentent de multiples signes apoptotiques, à ce jour, aucune donnée ne permet d'affirmer que les spermatozoïdes subissent un processus apoptotique identique à celui des cellules somatiques. Les spermatozoïdes sont particulièrement résistants à l'induction de mort *in vitro* [51], et il est possible que la survenue d'un processus apoptotique abortif puisse être observé dans les spermatozoïdes [52,53].

Sans provoquer la mort, l'apoptose incomplète n'est cependant pas sans conséquence cellulaire. Les cellules cardiaques en apoptose incomplète sont de véritables *cellules zombies* qui bien que survivantes présentent des troubles de la fonction contractile [49]. De la même manière, on peut émettre l'hypothèse que les spermatozoïdes qui présentent des stigmates apoptotiques soient peu fonctionnels [45]. Ces résultats posent un problème de définition puisque, l'apoptose définie par des altérations mitochondriales et/ou l'activation des caspases en l'absence de fragmentation nucléaire ne traduit plus un programme de mort mais un phénomène compatible avec la survie cellulaire. Dans ces conditions, peut-on encore parler d'apoptose ?

Il est désormais important que les recherches se poursuivent sur des modèles cellulaires plus pertinents comme des prélèvements humains pour comprendre les mécanismes de l'apoptose et leurs implications en pathologie. Ces travaux

devraient fournir alors les bases rationnelles nécessaires à la manipulation de la machinerie apoptotique à des fins thérapeutiques.

#### Références

- [1] Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239–57.
- [2] Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251–306.
- [3] Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 1999;59(7 Suppl):1701s–1706s.
- [4] Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;2(9):647–56.
- [5] Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992;356(6369):494–9.
- [6] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312–6.
- [7] Bursch W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 2001;8(6):569–81.
- [8] Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, et al. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 1997;15:1573–81.
- [9] Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, et al. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 1994;13:1017–30.
- [10] Lemasters JJ, Qian T, He L, Kim JS, Elmore SP, Cascio WE, et al. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal* 2002;4(5):769–81.
- [11] Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998;391(6662):96–9.
- [12] Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999;6(11):1028–42.
- [13] Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2003;10(1):76–100.
- [14] Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(6):401–10.
- [15] Adams JM, Cory S. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14(6):715–20.
- [16] Tinel A, Tschopp J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 2004;304(5672):843–6.
- [17] Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* 2000;466(1):6–10.
- [18] Tsujimoto Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol* 2003;195(2):158–67.
- [19] Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004;305(5684):626–9.
- [20] Brenner C, Kroemer G. Apoptosis. Mitochondria—the death signal integrators. *Science* 2000;289(5482):1150–1.
- [21] Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 2001;8(3):705–11.
- [22] Fadeel B, Zhivotovsky B, Orrenius S. All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. *FASEB J* 1999;13(13):1647–57.

- [23] Schmitz I, Kirchhoff S, Krammer PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32(11–12):1123–36.
- [24] Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102(1):33–42.
- [25] Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 2001;8(3):613–21.
- [26] Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, et al. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 2002;277(1):445–54.
- [27] van Gurp M, Festjens N, Van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304(3):487–97.
- [28] Gata S. Biddable death. *Nat Cell Biol* 1999;1(6):E143–E145.
- [29] Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441–6.
- [30] Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001;410(6828):549–54.
- [31] Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002;297(5579):259–63.
- [32] Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 2000;192(4):571–80.
- [33] Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001;412(6842):95–9.
- [34] Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D. Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2002;298(5598):1587–92.
- [35] Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, et al. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 1999;189:381–94.
- [36] Ricci JE, Munoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Bailly-Maitre B, Perkins GA, Yadava N, et al. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 2004;117(6):773–86.
- [37] Levy R, Seifer-Akkin I. Apoptosis during spermatogenesis and in ejaculated spermatozoa: importance for fertilization. *Ann Biol Clin (Paris)* 2001;59(5):531–45.
- [38] Sakkas D, Seli E, Manicardi GC, Nijs M, Ombelet W, Bizzaro D. The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail? *Hum Fertil (Camb)* 2004;7(2):99–103.
- [39] Blankenberg FG. Recent advances in the imaging of programmed cell death. *Curr Pharm Des* 2004;10(13):1457–67.
- [40] Hofstra L, Liem IH, Dumont EA, Boersma HH, van Heerde WL, Doevendans PA, et al. Visualisation of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction. *Lancet* 2000;356(9225):209–12.
- [41] Deas O, Dumont C, Macfarlane M, Rouleau M, Hebib C, Harper F, et al. Caspase-independent cell death induced by anti-cd2 or staurosporine in activated human peripheral t lymphocytes. *J Immunol* 1998;161(7):3375–83.
- [42] Arama E, Agapite J, Steller H. Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev Cell* 2003;4(5):687–97.
- [43] Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas Jr. AJ, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 2003;80(3):531–5.
- [44] de Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM. Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod* 2003;68(6):2122–34.
- [45] Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 2002;17(5):1257–65.
- [46] Nevriere R, Fauvel H, Chopin C, Formstecher P, Marchetti P. Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(1):218–25.
- [47] Fauvel H, Marchetti P, Obert G, Joulain O, Chopin C, Formstecher P, et al. Protective effects of cyclosporin A from endotoxin-induced myocardial dysfunction and apoptosis in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(4):449–55.
- [48] Reed JC, Paternostro G. Postmitochondrial regulation of apoptosis during heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(14):7614–6.
- [49] Narula J, Arbustini E, Chandrasekhar Y, Schwaiger M. Apoptosis and the systolic dysfunction in congestive heart failure. Story of apoptosis interruptus and zombie myocytes. *Cardiol Clin* 2001;19(1):113–26.
- [50] Burgess DH, Svensson M, Dandrea T, Gronlund K, Hammarquist F, Orrenius S, et al. Human skeletal muscle cytosols are refractory to cytochrome c-dependent activation of type-II caspases and lack APAF-1. *Cell Death Differ* 1999;6(3):256–61.
- [51] Weil M, Jacobson MD, Raff MC. Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes. *J Cell Sci* 1998;111(Pt 18):2707–15.
- [52] Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999;251(2):350–5.
- [53] Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod* 2004;71(1):28–37.