

Un système endonucléolytique dévolu à l'accomplissement des basses œuvres de l'apoptose

A sa phase terminale, l'apoptose est associée au clivage de l'ADN chromosomique entre les nucléosomes, de telle sorte qu'une électrophorèse de l'ADN de cellules apoptotiques donne un aspect en échelle dû à la création de fragments correspondant à un nombre varié de nucléosomes. Cette année, nous avons rapporté la description de la protéine DFF45 (*DNA-fragmentation factor 45*) qui intervient en aval de la caspase 3 dans la fragmentation de l'ADN (*m/s n° 8/9, vol. 13, p. 1076*). La protéine DFF45 était plutôt considérée comme l'un des partenaires d'un système endonucléolytique mobilisant des endonucléases cellulaires qui interviennent dans d'autres phénomènes que l'apoptose. C'est à une conclusion inverse que parvient le laboratoire de Shigekazu Nagata, de Osaka, au Japon. Dans deux articles publiés dans le numéro du 1^{er} janvier 1998 de *Nature*, ces auteurs montrent que les constituants du complexe endonucléolytique activé au cours de l'apoptose sont spécifiques de ce phénomène [1, 2]. Les auteurs ont observé qu'une activité endonucléolytique apparaissait dans des cellules en voie d'apoptose. Cette activité pouvait être bloquée par des extraits cytoplasmiques de cellules non apoptotiques. Ces résultats permettaient d'identifier un système inhibiteur et un système activateur de la dégradation de l'ADN au cours de l'apoptose. L'inhibiteur fut d'abord isolé par des méthodes biochimiques, ce qui fut aisé car il se révéla résistant à un chauffage à 90° en présence d'un agent dénaturant, le SDS. Les quelques protéines résistant à ce trai-

tement furent séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, et une protéine de 32 kDa, dotée de l'activité inhibitrice, fut purifiée et sa séquence protéique partiellement établie. Celle-ci correspondait à une EST (*expressed sequence tag*) présente dans les banques de données. Dès lors, deux clones furent rapidement isolés, codant pour des protéines de 331 et de 265 acides aminés. Ces inhibiteurs, appelés ICAD-L et ICAD-S sont les équivalents murins de la protéine DFF45 préalablement décrite (*m/s n° 8/9, vol. 13, p. 1076*).

La purification de l'élément activateur, appelé CAD (*caspase-activated-deoxyribonuclease*) fut beaucoup plus difficile et exigea une phase de chromatographie d'affinité sur une colonne sur laquelle était immobilisée la protéine DFF45. En effet, l'inhibiteur ICAD/DFF45 et l'activateur CAD forment un complexe qui peut être détruit par dégradation protéolytique de ICAD/DFF45 sous l'action de la caspase 3. Cette méthode fut utilisée pour éluer spécifiquement la protéine CAD qui fut alors soumise à un microséquençage protéique. Des oligonucléotides dégénérés furent ensuite synthétisés et utilisés pour obtenir par PCR un fragment de 332 paires de bases, lui-même utilisé comme sonde pour cloner un ADNc codant pour la nucléase CAD, de 345 acides aminés. Cette nucléase n'était pas connue auparavant. Dans la cellule non-apoptotique, elle existe sous la forme d'un complexe avec ICAD/DFF45, cet inhibiteur étant la cible spécifique de la caspase activée par la cascade apoptique. Dès lors, CAD est

libérée et, contenant une séquence de localisation nucléaire, est transférée dans le noyau où elle peut entraîner la dégradation internucléosomique caractéristique de la phase terminale de l'apoptose. Dans des cellules soumises à un signal apoptique, l'hyperexpression de l'inhibiteur ICAD/DFF45 à l'aide d'un vecteur d'expression bloque la dégradation de l'ADN, mais non pas la mort par apoptose qui semble donc être un phénomène indépendant de l'activation endonucléolytique. L'existence d'un système de dégradation de l'ADN totalement dévolu à l'exécution de la phase terminale de l'apoptose, alors que cette dégradation n'est pas impliquée dans la mort cellulaire, peut sembler singulière. Peut-être peut-on formuler l'hypothèse que cette dégradation de l'ADN est une nécessité pour assurer la stabilité génétique des cellules avoisinantes. En effet, le destin d'une cellule morte par apoptose est d'être englobée par des cellules voisines, macrophages professionnels ou non professionnels. Si l'ADN de ces cellules mortes était intact, il pourrait peut-être se recombinaison avec celui de la cellule phagocytaire, provoquant une instabilité génomique. La dégradation de l'ADN avant la phase d'englobement écarte ce danger.

A.K.

1. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa S, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391: 43-50.
2. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391: 96-9.