

Les formes membranaire et soluble du ligand de Fas : une périlleuse alternative

Au cours de ces dernières années furent peu à peu découverts les différents protagonistes de l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, scénario redoutable mais essentiel au développement et à l'homéostasie des organismes multicellulaires [1, 2] et (*m/s n° 4, vol. 13, p. 598*). Chez l'homme, il a été démontré que l'apoptose est aussi un excellent moyen de défense contre les virus et les oncogènes, et qu'elle joue un rôle important dans les processus inflammatoires et immunitaires (*m/s n° 12, vol. 11, p. 1756; n° 4, vol. 13, p. 612 et n° 6-7, vol. 13, p. 1263*), pour ne citer que quelques-uns des multiples aspects de ce sujet aux perspectives considérables [3].

Parmi les signaux inducteurs d'apoptose, deux importantes voies, mises en route par la liaison du ligand Fas (FasL) (*m/s n° 2, vol. 10, p. 234, n° 6-7, vol. 10, p. 735, et n° 8, vol. 11, p. 1178*) et du TNF (*tumor necrosis factor*) [4] à leurs récepteurs, occupent le devant de la scène depuis cinq ans. La protéolyse de substrats protéiques essentiels à la survie de la cellule (*m/s n° 11, vol. 12, p. 1263*), et le clivage internucléosomique de l'ADN chromosomique (*m/s n° 6-7, vol. 13, p. 862 et n° 8-9, vol. 13, p. 1076, n° 3, vol. 14, p. 326*) s'accomplissent après l'activation d'un effecteur ultime : les caspases, dont l'importance et les nombreuses implications ont encore été soulignées tout récemment dans *médecine/sciences* [5].

De nouveaux éléments fort intéressants viennent d'être apportés par l'équipe de Nagata (Osaka Japon), pionnière dans l'étude du système Fas, qui avait démontré l'existence d'une forme soluble de FasL (sFasL), se détachant de la forme membra-

naire (mFasL) sous l'action d'une métalloprotéinase encore inconnue [6]. On sait que le ligand de Fas est exprimé sous forme membranaire (mFasL) principalement par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK après activation, et que cette expression induite est responsable (en partie) de la cytotoxicité exercée par ces cellules immunitaires sur leurs cellules cibles, infectées par des virus, transformées, ou encore allogéniques ou vieillissantes. En effet, le mFasL contacte le récepteur Fas de la cellule cible où il met en route le programme d'apoptose, à savoir l'activation en cascade des protéases à cystéine, les caspases.

Afin de pouvoir comparer les voies de transmission du signal apoptotique induites par chacun des deux ligands mFasL et sFasL, les auteurs japonais ont d'abord purifié le ligand humain sFasL à partir d'une lignée cellulaire libérant sFasL dans le milieu de culture [7] ; mis en présence de cellules Jurkat, qui expriment le récepteur Fas et sont induites en apoptose par des anticorps anti-Fas, sFasL n'agit que faiblement, 40 % seulement des cellules étant détruites après quatre jours d'incubation en présence de 100 ng/ml de sFasL. Ils ont alors recherché le site de clivage permettant de passer de la forme membranaire à la forme soluble : il s'agit d'une séquence Glu-Lys-Gln-Ile, située dans la région extracellulaire. La délétion de cette région empêche le clivage mais ne modifie pas le pouvoir apoptotique du complexe FasL-Fas formé ultérieurement. Des vecteurs d'expression pour FasL, comportant une série de délétions au site de clivage, ont alors été

construits, et ceux codant pour un FasL non clivable ensuite sélectionnés. L'étude comparative de mFasL et sFasL produits par des lignées de cellules T de souris transformées a confirmé la faible toxicité de la forme soluble sur cellules Jurkat, ainsi qu'en culture primaire d'hépatocytes de souris. En outre, l'équipe de Nagata a montré clairement que sFasL a le pouvoir d'inhiber l'action cytolytique de la forme membranaire. Les auteurs supposent donc que, comme pour le complexe TNF/récepteur du TNF, il se produirait, en présence du ligand soluble, une internalisation du complexe sFasL-Fas. Dans ces conditions, la caspase-8, un des premiers acteurs de la transmission du signal, activée essentiellement dans le DISC (*death inducing signaling complex*) au niveau de la membrane plasmique, n'entrerait pas en jeu ou seulement très faiblement. Il semble donc que la forme membranaire de FasL soit la forme fonctionnelle. Dans la réaction immune, les lymphocytes cytotoxiques reconnaissent et sont activés par les cellules cancéreuses ou infectées par des virus. Les cellules cibles sont alors tuées par le mécanisme mis en marche par mFasL, processus qui serait freiné par le détachement de FasL sous forme soluble, afin de limiter l'action de mFasL.

On pourrait donc considérer qu'il existe une voie principale vers l'apoptose, à partir du complexe Fas-mFasL par activation de la pro-caspase 8, qui peut être inhibée par les protéines virales FLIP (*viral FLICE inhibitory proteins*) (*figure 1*). D'autres voies de signalisation pourraient entrer en jeu où sFasL jouerait un rôle. Par l'intermédiaire de Daxx (une nouvelle pro-

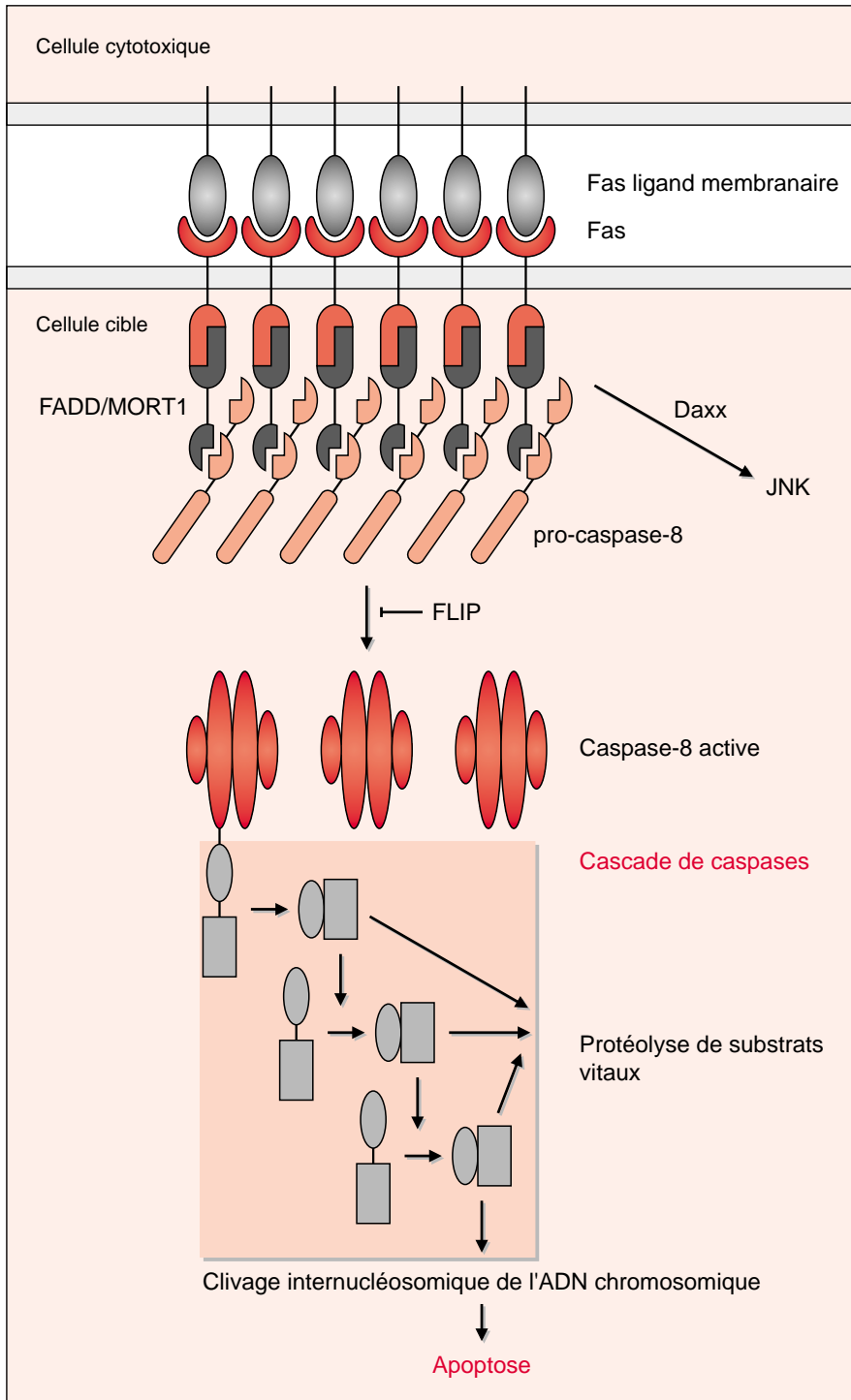


Figure 1. **Apoptose induite par mFasL-Fas : voie principale.** La liaison du FasL membranaire à Fas induit une trimérisation du récepteur Fas qui, par l'intermédiaire de FADD/MORT1, recrute et active l'enzyme caspase-8. Cette activation peut être freinée par FLIP. Puis sont activées d'autres caspases pour la protéolyse de substrats vitaux de la cellule, suivi du clivage internucléosomique de l'ADN chromosomique. (D'après [8].)

* GLOSSAIRE *

Fas=CD95=APO1. Il est porté en quantité variable par de nombreux types de cellules.

FasL: ligand de Fas. il est exprimé surtout dans les cellules NK (natural killer) et les lymphocytes T activés. Il existe sous forme membranaire (mFasL) et sous forme soluble (sFasL).

DISC: Death inducing signaling complex.

TNF: tumor necrosis factor.

FADD/MORT1: Fas associating protein with death domain.

DED: death effector domain ou **MORT1**: région amino-terminale impliquée dans la transmission du signal.

Caspases: divisées en trois sous-familles

caspase-1: ICE, caspase-2: ICH-1, caspase-3: CPP32.

ICE: interleukine-1 β converting enzyme.

FLICE: FADD-like ICE = MACH: MORT1-associated CED-3 homologue = caspase-8.

FLIP: viral FLICE inhibitory proteins.

NF- κ B: facteur de transcription détecté initialement dans les lymphocytes B.

JNK: c-Jun amino-terminal kinase (ou **SAPK**: stress-activated protein kinase).

NIK: NF- κ B inducing kinase.

IKK: I κ B kinase α et β .

téine associée au domaine de mort de Fas) [10], l'apoptose serait induite par la voie JNK. En outre, l'activation de NF- κ B et/ou la sécrétion d'interleukine-8 par les anticorps anti-Fas dans certaines lignées cellulaires pourrait impliquer sFasL (m/s n° 11, vol. 12, p. 1260); c'est là qu'entrent en jeu les dernières pièces du puzzle du système NF- κ B, à savoir NIK (NF- κ B inducing kinase) [11], formant un complexe avec les kinases IKK α et IKK β (I κ B kinases) [12] (figure 2). L'activation de la voie NF- κ B pourrait s'opposer aux effets apoptotiques dans le système Fas, comme dans le système TNF.

Ces hypothèses, qui ne manquent pas d'intérêt, méritent confirmation. En

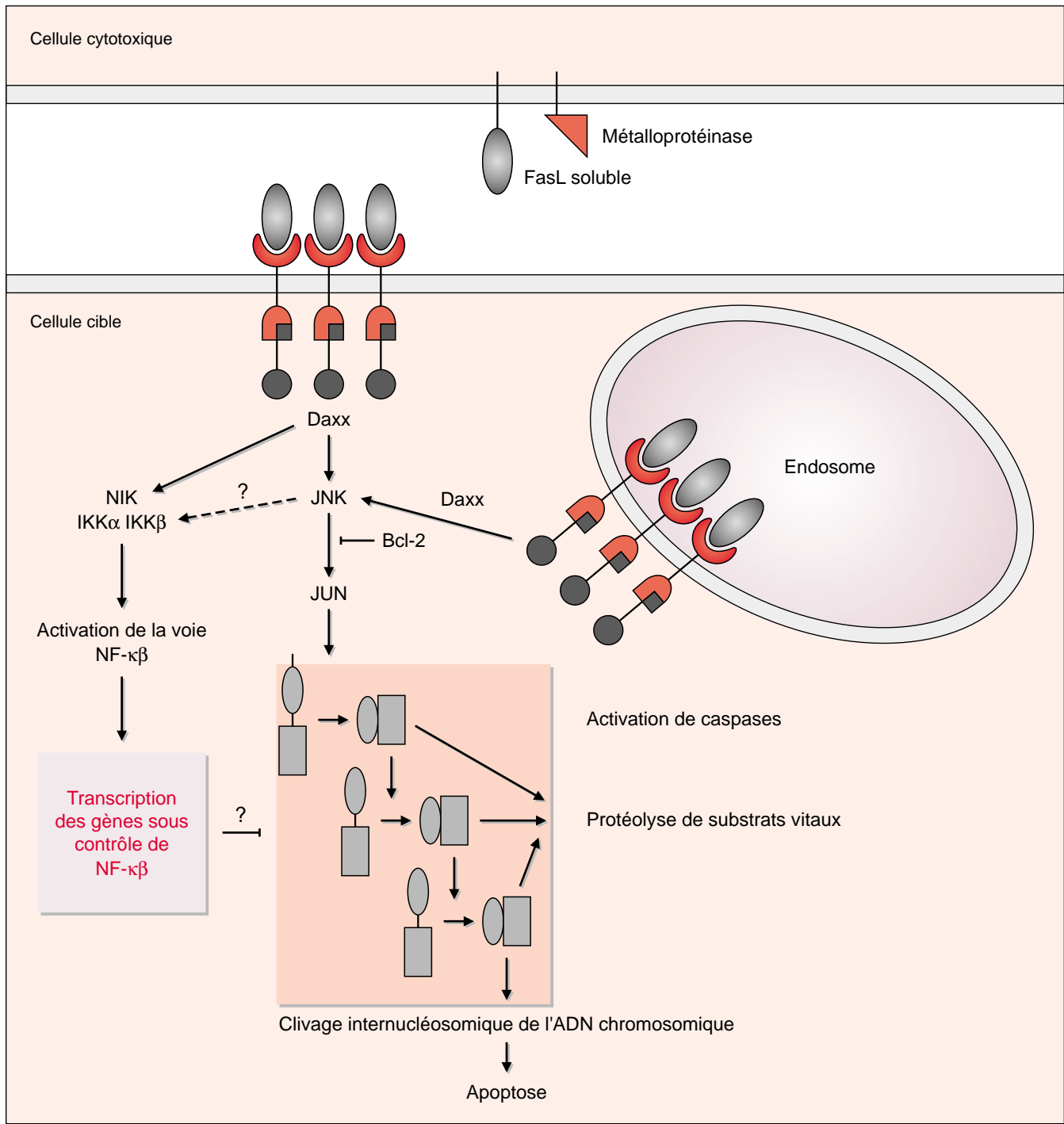


Figure 2. **Rôles éventuels du FasL soluble (sFasL), détaché de mFasL par une métalloprotéinase.** Le complexe sFasL-Fas est internalisé, empêchant la formation du signal apoptotique. En présence du FasL soluble, et par l'intermédiaire de Daxx, l'activation de la voie Jun kinase (JNK) pourrait mettre en route les mécanismes apoptotiques. La voie NF-κB (m/s n°3, vol. 11, p.467 et n° 11, vol. 12 p.1260) pourrait aussi être activée, soit directement par Daxx, soit éventuellement par la voie JNK. Comme dans le système TNF, il y aurait alternative entre voie NF-κB, avec transcription des gènes sous son contrôle, et voie apoptotique. (D'après [8].)

attendant, force est de constater que le système Fas apparaît encore d'une grande complexité.

A.M.
S.G.

1. Martinou J. La mort cellulaire programmée dans le système nerveux. *Med Sci* 1995; 11: 367-73.
2. Golstein P. Deux mécanismes moléculaires pour la cytotoxicité T: perforine granzymes et Fas. *Med Sci* 1995; 11: 99-104.
3. May P. Apoptose: perspectives et promesses. *Med Sci* 1998; 14: 6-8.

4. Gueydan C, Coessens E. Avancées et perspectives de la recherche sur le facteur de nécrose tumorale (TNF). *Med Sci* 1997; 13: 83-8.
5. Mignon A, Rouquet N, Joulin V. Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose: un enjeu thérapeutique pour demain? *Med Sci* 1998; 14: 9-17
6. Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 1995; 14: 1129-35.
7. Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Down-regulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 1998; 4: 31-6.

8. Strasser A, O'Connor L. Fas ligand-caught between Scylla and Charybdis. *Nat Med* 1998; 4: 21-3.
9. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-65.
10. Yang X, Khosravi-Far R, Chang H, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that inactivates JNK and apoptosis. *Cell* 1997; 89: 1067-76.
11. Baeuerle PA. Pro-inflammatory signaling last pieces in the NF- κ B puzzle? *Curr Biol* 1998; 8: R19-R22.
12. Mignon A, Bursaux E. Glucocorticoïdes et inhibition du système NF- κ B. *Med Sci* 1996; 12: 236.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **L'inactivation du gène de la prolactine entraîne des altérations du développement mammaire, mais n'a aucun retentissement sur l'hématopoïèse.** Plusieurs arguments suggèrent que la prolactine intervient dans la régulation de la différenciation hématopoïétique: le récepteur de la prolactine est présent à la surface de la majorité des précurseurs et progéniteurs hématopoïétiques, sa structure est proche de celle de nombreux récepteurs de cytokines, dont l'érythropoïétine ou le GM-CSF et, son activation met en jeu la voie de Stat-5 [1]. L'hormone est synthétisée par des lymphocytes et des cellules stromales médullaires [2], et *in vitro*, la prolactine module la réponse immunitaire en agissant sur les effecteurs lymphocytaires et, en synergie avec les cytokines hématopoïétiques, stimule la prolifération de progéniteurs hématopoïétiques érythroïdes. Toutefois, ces observations ne prouvent en rien qu'*in vivo* cette hormone ait un rôle essentiel au développement hématopoïétique. L'analyse de souris dont le gène *Prl* a été inactivé apporte des éléments de réponse [3]. L'insertion du gène de résistance à la néomycine dans la région du gène codant pour la seconde hélice α de

la prolactine a pour résultat la sécrétion d'une protéine tronquée, immunoréactive, mais dépourvue d'activité fonctionnelle. La proportion de nouveau-nés homozygotes obtenue était normale, et l'absence de prolactine n'a aucune conséquence sur la croissance des animaux. Deux types d'anomalies prédominent: (1) la fonction de reproduction est altérée, puisque les femelles homozygotes, au contraire des mâles *Prl*^{-/-}, ne sont pas fertiles, ce qu'explique peut-être une anomalie d'implantation de l'œuf fécondé. Les organes génitaux ne présentent aucune anomalie structurale; (2) la différenciation de la glande mammaire est très anormale, avec en particulier une absence de structures lobulaires terminales des canalicules. Il est intéressant de souligner que des anomalies de la fonction de reproduction et du développement mammaire sont aussi présentes chez les souris déficientes en récepteur de prolactine, ou en facteur Stat5a ou Stat5b [1]. Ces anomalies sont toutefois différentes de celles qui sont décrites ici pour les souris *Prl*^{-/-}, suggérant une redondance ou des phénomènes de compensation dans les différents signaux néces-

saires au développement de l'appareil reproducteur. Les souris *Prl*^{-/-} ne présentent aucune anomalie quantitative ou qualitative du développement hématopoïétique. La différenciation des lignées lymphoïdes B et T, particulièrement étudiée puisque ce sont les cibles privilégiées d'action de l'hormone *in vitro*, est normale, de même que la répartition des sous-populations lymphocytaires T et la fonction des effecteurs lymphocytaires, du moins au cours de la réponse immunitaire primaire. La possibilité d'un déficit de la réponse immunitaire secondaire n'a pas été testée. Si ces données *in vivo* infirment que la prolactine ait, seule, un rôle majeur dans le développement hématopoïétique, du moins à l'état d'équilibre, elles n'excluent pas que l'hormone puisse avoir un rôle adjuvant dans une situation de *stress* hématopoïétique, ou dans les tests *in vitro*, ce que démontrent les observations antérieures.

[1. Binart N, *et al. Med Sci* 1997; 13: 734-6.]

[2. Bellone G, *et al. Blood* 1997; 90: 21-7.]

[3. Horseman ND, *et al. EMBO J* 1997; 16: 6926-35.]

ERRATUM

Dans la mini-synthèse: «La famille Ptx des facteurs à homéodomaine» par J. Drouin, C. Lanctôt, J.J. Tremblay (*m/s n° 3, mars 98, p. 335-9*):

- Figure 1, p. 335, il fallait lire Ptx2/Rieg et non pas Ptx2/Tieg;

- Figure 2, p. 337, le gel d'électrophorèse est inversé (haut \rightleftharpoons bas).

Nous prions les auteurs de bien vouloir nous en excuser.

La rédaction