

Le neurone : un condamné à mort en sursis permanent ?

La mort neuronale programmée est un mécanisme fondamental du développement et de la maturation du système nerveux. Au cours de la maturation, l'ajustement du nombre de neurones fonctionnels au sein de chaque structure est principalement réalisé par l'élimination des neurones surnuméraires. Ces neurones dégèrent en présentant les caractéristiques morphologiques (condensation du noyau, fractionnement cellulaire) et métaboliques (altération de l'activité mitochondriale) de l'apoptose [1]. L'analyse des mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'apoptose dans des modèles neuronaux *in vitro* a montré que la mort neuronale peut être empêchée ou retardée par des traitements pharmacologiques bloquant la transcription des gènes ou la traduction des ARNm en protéines [2, 3]. Cela conduit à postuler que l'apoptose résulte de l'exécution d'un programme génétique coordonné au cours duquel l'activité métabolique et énergétique de la cellule alimente des cascades de signaux activant des molécules exécutrices du programme de mort cellulaire. Les mécanismes responsables du passage de l'état « silencieux » de ce programme dans les conditions de survie à l'état « actif » au cours de l'apoptose sont très peu connus. Nos connaissances actuelles suggèrent plutôt un modèle dans lequel l'apoptose serait partie intégrante du répertoire génétique d'un neurone différencié ; sa réalisation serait en permanence réprimée par l'action des signaux neurotrophiques. En d'autres termes, l'apoptose serait un programme génétique qui n'aurait de manifestations phénotypiques

que lorsque sont réunies certaines conditions intrinsèques et/ou liées à l'environnement.

Mort neuronale programmée et contrôle du cycle cellulaire

Les étapes de la différenciation terminale des neurones nécessitent un verrouillage efficace du cycle cellulaire. Cependant, les neurones différenciés restent la cible de signaux ou d'événements somatiques (lésions, mutations) qui tendent à remettre en route la prolifération. Une hypothèse actuelle postule que les cellules post-mitotiques différenciées répondent à cette tentative inappropriée de réactivation du cycle cellulaire en engageant le programme d'apoptose. Dans de nombreux modèles, l'attention s'est donc concentrée sur la régulation et la fonction des gènes contrôlant le cycle cellulaire au cours de la mort neuronale.

Le cycle cellulaire est contrôlé par plusieurs familles fonctionnelles de gènes, agissant à différents niveaux. On peut distinguer notamment les gènes suppresseurs de tumeurs (*p53*, *RB*), les gènes précoces (*c-fos*, *c-myc*, *c-jun*...) agissant comme facteurs de transcription et les cyclines ainsi que les kinases et inhibiteurs de kinases qui leur sont associés (figure 1). L'activité du produit de ces gènes diffère selon le type cellulaire et le contexte physiologique ; leur dérégulation aboutit à une prolifération cellulaire incontrôlée ou à l'exécution du programme d'apoptose. Plusieurs études ont démontré que l'état d'oxydation de la cellule définit sa sensibilité à l'apoptose induite par *p53* et que la synthèse de *p53* est induite dans les neurones au cours du *stress oxydatif*.

L'invalidation d'un autre gène suppresseur de tumeur, le gène de susceptibilité au rétinoblastome (*RB*), provoque la prolifération anormale associée à l'apoptose des cellules nerveuses au cours du développement. Cette mutation est létale au stade embryonnaire. Enfin, les gènes précoces *c-myc* et *c-jun* contrôlant la prolifération cellulaire sont sélectivement activés au cours de l'apoptose [4, 5]. L'étape déterminante du cycle dans le choix entre apoptose et division cellulaire est le franchissement du point de restriction G1/S (figure 1). La transition entre les phases G et S est essentiellement sous le contrôle des cyclines de type D chez les eucaryotes. L'activation de ces cyclines peut représenter un maillon essentiel dans l'étude du lien existant entre cycle cellulaire et mort cellulaire programmée.

Une première étude de Freeman *et al.* [6] démontre que l'expression de la cycline D1 est sélectivement induite au cours de l'apoptose des neurones du ganglion sympathique, alors que l'expression de nombreux autres gènes du cycle cellulaire (dont ceux qui codent pour *p53*, les cyclines A, B, C ou les Cdk (*cyclin-dependent kinases*) n'est pas modifiée ou réprimée [6]. La cycline D1 forme un complexe multimérique avec des kinases (CDC2, Cdk2, Cdk4, C5...), des inhibiteurs de ces kinases ou CKI (*p21^{waf1/cip1}*, *p16^{ink4}*, *p27^{kip1}*...) et une protéine nucléaire (PCNA) impliquée dans la réplication de l'ADN [7]. L'association de la cycline et d'une Cdk modifie l'activité de cette dernière et lui confère une spécificité de substrat [8]. Dans les neurones sympathiques apoptotiques, l'expression de la cycline D1 est maximale au

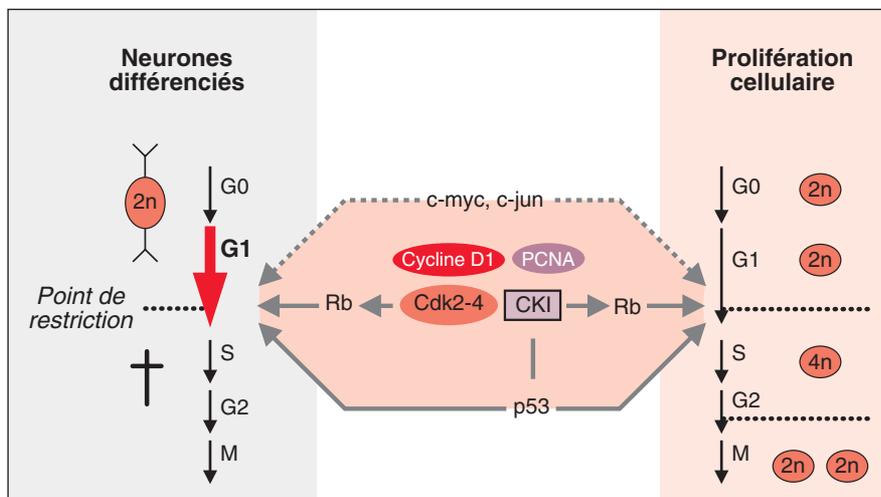


Figure 1. **Schéma hypothétique du contrôle de la phase G1 du cycle cellulaire.** Le point de restriction en phase G1 du cycle cellulaire permet un contrôle des paramètres nécessaires à l'entrée en phase de synthèse d'ADN (S). Un deuxième point de restriction existe entre les phases G2 et de mitose (M). Le cycle cellulaire des neurones différenciés est verrouillé avant le point de restriction G1/S. La réactivation des protéines du cycle cellulaire et notamment celles de la phase G1 induit l'apoptose dans ces cellules. La progression en phase G1 vers le point de restriction est essentiellement contrôlée par un complexe multimérique incluant la cycline D1. La cycline D1 s'associe préférentiellement à des Cdk (cyclin-dependent kinases) de type 2 et 4 dont elle règle l'activité. L'activité de ces kinases est également réglée par des CKI (cyclin-dependent kinase inhibitors) plus ou moins sélectifs ($p21^{waf1/Cip1}$, $p16^{ink4}$, $p27^{kip1}$...). Enfin, le PCNA (proliferating cell nuclear antigen) intervenant dans la synthèse d'ADN peut également s'associer à ce complexe. Les interactions entre les cyclines et les autres familles de protéines contrôlant la prolifération n'est pas clairement établie. Cependant, on sait que les Cdk 2-4 phosphorylent la protéine Rb et contrôlent ainsi l'activité des facteurs de transcription qui lui sont associés. L'expression de la CKI $p21^{waf1/Cip1}$ est réglée par p53. Le rôle des produits des gènes précoces c-myc et c-jun dans la prolifération cellulaire et l'apoptose neuronale est démontré mais leurs cibles précises ne sont pas connues.

moment où les neurones passent le point de restriction indiquant un engagement irréversible dans l'étape d'exécution de l'apoptose. Dans les lignées neuronales différenciées N1E-115, l'accumulation de la cycline D1 au cours de l'apoptose induit une augmentation de l'activité de la Cdk4 et la phosphorylation de Rb [9]. La surexpression de la cycline D1 induit l'apoptose dans les mêmes cellules. La fonction de la cycline D1 dans la mort neuronale semble dépendre de l'activité du complexe qu'elle forme avec les Cdk et CKI. En effet, l'inhibition de l'activité de ce complexe par un inhibiteur de kinases s'associant préférentiellement à la cycline D1 ($p16^{ink4}$) bloque l'apoptose [10]. L'ensemble de ces résultats montre que, dans les neurones, l'induction

de la cycline D1 est concomitante de l'exécution du programme de mort neuronale.

Régulation de la cycline D1 au cours de l'apoptose du neurone en grain du cervelet

Nous avons choisi d'étudier la régulation de la cycline D1 au cours de l'apoptose dans un modèle *in vitro* de neurones en grain du cervelet [11] qui se différencie et survit en présence de concentrations dépolarisantes de potassium extracellulaire (25 mM) [12, 13]. Cette dépolarisation chronique, par les influx calciques qu'elle engendre, pourrait mimer le rôle des afférences excitatrices *in vivo* et déterminer le degré de dépendance des neurones vis-à-vis

des facteurs neurotrophiques pour leur survie [14]. La déplétion du potassium extracellulaire (de 25 mM à 5 mM) induit l'apoptose dans ce modèle. Cela se traduit par la fragmentation de l'ADN génomique, la production de radicaux libres et la perte de l'activité mitochondriale qui sont des caractères établis de l'apoptose [3, 13, 15].

La cycline D1 est faiblement présente dans les conditions favorisant la survie, mais s'accumule rapidement lorsque l'apoptose est provoquée par déplétion potassique (figure 2). Cette accumulation de cycline D1 précède le point de restriction (12 heures de déplétion potassique dans notre modèle) après lequel les neurones sont engagés dans l'étape d'exécution de l'apoptose. Le produit d'un gène du cycle cellulaire s'accumule donc au cours de l'apoptose des neurones en grain *in vitro*. Cependant, des études de RT-PCR semi-quantitatives permettant d'estimer la variation relative de la concentration d'ARNm de la cycline D1 et la mesure de l'activité transcriptionnelle du promoteur de la cycline D1 ont montré que l'expression du gène n'est pas induite par la déplétion potassique (figure 1) [16]. Nous sommes donc en présence d'une situation où une protéine s'accumule alors même que ni l'activité du promoteur de son gène ni la concentration de son ARNm ne varient. Ce résultat, s'il se confirmait pour d'autres gènes du cycle cellulaire, remettrait en cause l'idée actuelle des mécanismes de l'apoptose. On suppose en effet aujourd'hui que celle-ci est déclenchée par l'activation de gènes qui ne sont pas exprimés dans les conditions de survie. La rupture de ces conditions provoquerait l'induction de ces gènes et l'exécution du programme d'apoptose [17]. Nos résultats suggèrent, au contraire, que l'un au moins des gènes responsables de l'apoptose est constamment exprimé et que son produit est présent en faible quantité dans le neurone en survie. Cela signifie que le produit de ce gène doit être dégradé dans ces mêmes conditions de survie. Par ailleurs, son accumulation rapide au cours de l'apoptose se réalise alors que l'activité transcriptionnelle de son gène reste identique,

ce qui laisse supposer que la dégradation de la protéine est ralentie voire arrêtée dans ces conditions. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié les voies de dégradation des protéines du cycle cellulaire dans le contrôle de la concentration de cycline D1 et de la survie neuronale.

La dépolarisation chronique des neurones contrôle l'activité du protéasome, responsable de la dégradation de la cycline D1

La dégradation de la cycline D1, au même titre que celle de nombreuses autres protéines du cycle cellulaire dont la demi-vie est courte, est réalisée en deux étapes. La première étape consiste en une polyubiquitination de la protéine [18]. Les protéines ubiquitinées sont rapidement clivées par un complexe multimérique, le protéasome. Le système ubiquitine/protéasome est la voie

majeure de dégradation des protéines du cycle cellulaire. Son activité peut participer, selon l'environnement physiologique, à l'option que choisit la cellule entre la prolifération, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose [19]. Dans un premier temps, nous avons montré que le blocage de l'activité du protéasome par des inhibiteurs spécifiques [20] induit une augmentation massive et rapide de la concentration de cycline D1 dans les neurones maintenus dans des conditions de survie (HK). Dans les mêmes conditions, l'activité transcriptionnelle du gène et l'accumulation d'ARNm ne sont pas modifiées (figure 3). Nous avons également établi que l'inhibition de l'activité du protéasome se traduit par une fragmentation rapide de l'ADN et une très forte diminution de la survie neuronale. L'inhibition du protéasome produit donc des résultats identiques à ceux de la déplétion potassique. Ces effets sont totalement inhibés par un co-traitement par la cycloheximide qui

bloque la synthèse protéique (figure 3). Cela indique clairement, d'une part, que la perte de la fonction du protéasome provoque l'apoptose neuronale (du moins *in vitro*); d'autre part, que l'accumulation de la cycline D1 dont la dégradation est inhibée mais sans activation de son gène est due au fait que la synthèse de cette protéine s'effectue à partir d'un *pool* préexistant d'ARNm.

Comme l'apoptose induite au cours de la déplétion potassique repose sur une diminution des influx calciques

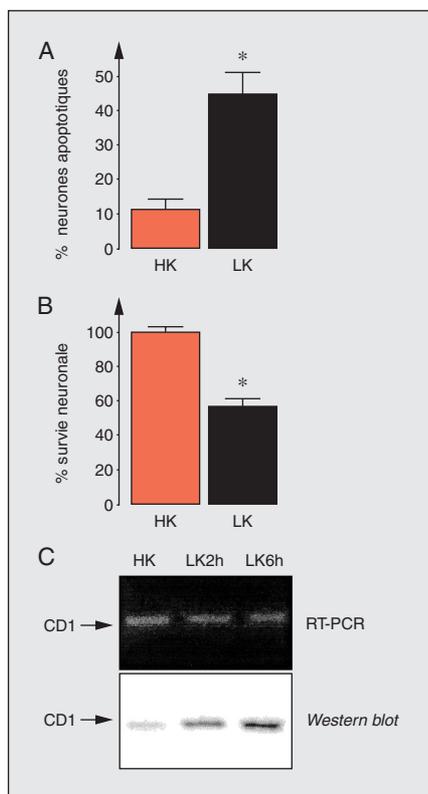


Figure 2. **La dépolarisation contrôle l'apoptose neuronale et l'accumulation de cycline D1.** A. La déplétion en potassium extracellulaire induit l'apoptose du neurone en grain. Les neurones sont, soit cultivés dans des conditions de survie (HK = 25 mM K⁺ extracellulaire), soit traités pendant 12 heures en présence d'une concentration basse de potassium (LK = 5 mM K⁺ extracellulaire). La fragmentation de l'ADN est mesurée par la technique TUNEL fondée sur l'incorporation de bases modifiées aux extrémités 3'OH créées par le clivage de l'ADN génomique. Les résultats représentent le pourcentage de neurones fragmentés par rapport aux neurones totaux dans les deux conditions. B. Les tests de survie sont réalisés à l'aide de la technique MTT fondée sur l'activité mitochondriale de la cellule. Les résultats indiquent une diminution d'environ 50% de la survie neuronale après 24h de culture en LK comparé aux conditions de survie (HK). C. Les mesures des concentrations relatives d'ARNm et de protéines sont réalisées par RT-PCR et Western blot. Les RT-PCR

sont effectuées dans des conditions dans lesquelles la linéarité de l'amplification est respectée. Ces deux résultats indiquent clairement que l'accumulation de cycline D1 (CD1) observée en LK ne repose pas sur la stimulation de la transcription de son gène.

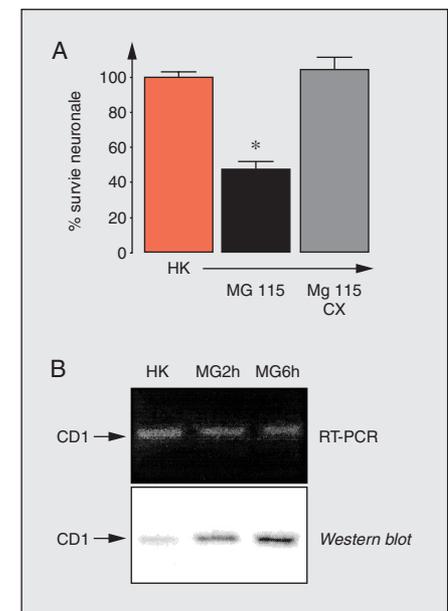


Figure 3. **Les effets de la déplétion potassique sont reproduits par l'inhibition de l'activité du protéasome.** A. Les cellules maintenues dans des conditions de survie (HK) sont traitées pendant un temps court (3h) avec des inhibiteurs de l'activité du protéasome (MG 115, 40 μM). Le test MTT effectué 18h après montre la diminution importante de la survie neuronale suite à ce traitement. Cet effet est entièrement aboli par un co-traitement par la cycloheximide (CX 10 μg/ml) qui inhibe la synthèse protéique. B. Les mesures des ARNm et des protéines par RT-PCR et Western blot montrent que l'inactivation du protéasome ne modifie pas la transcription du gène codant pour la cycline D1 (CD1) mais induit une accumulation de la protéine liée à l'inhibition de sa dégradation.

[2], nous avons analysé le rôle potentiel de la dépolarisation et des influx calciques qu'elle engendre dans le contrôle de l'activité du protéasome. Nos résultats indiquent que l'état de dépolarisation du neurone règle directement la dégradation de la cycline D1 par le protéasome. Les variations de concentration de calcium intracellulaire dans les conditions de survie (HK) ou d'apoptose (LK) permettent respectivement la répression ou l'élévation de la concentration de cycline D1 (figure 4).

Conclusion : le contrôle nécessaire du programme latent de mort neuronale

L'accumulation de cycline D1 au cours de l'apoptose induite par déplétion potassique confirme le rôle des gènes du cycle cellulaire dans l'apoptose neuronale. On peut supposer que, dans les étapes précoces de l'apoptose, l'accumulation des protéines contrôlant le cycle cellu-

laire peut activer la transmission de signaux induisant l'expression des gènes responsables de l'exécution de la mort neuronale.

Le blocage de l'activité du protéasome ou des influx calciques provoque une mort neuronale massive. Ces résultats indiquent clairement que l'activité du protéasome réprime l'accumulation d'au moins un facteur essentiel dans l'exécution du programme de mort neuronale. Celui-ci pourrait être la cycline D1 ou une autre des protéines du cycle cellulaire qui sont des substrats du protéasome: cycline, CKI (p27^{Kip1}), facteurs de transcription (E2F)... C'est en ce sens que l'on peut considérer que le neurone est un condamné à mort en sursis permanent: son sursis est lié à sa capacité de dégrader le produit des gènes de la mort neuronale qu'il exprime en permanence. Par ailleurs, si les signaux décidant de la survie ou de la mort neuronale sont intégrés par un « capteur » intracellulaire [20], le protéasome peut être un candidat sérieux à cette fonc-

tion. Les résultats obtenus indiquent déjà sa participation aux effets neurotrophiques du calcium liés à l'activité électrique du neurone.

Le fait que la survie neuronale soit directement liée à un système de dégradation protéique permet de faire le lien avec des travaux montrant que l'exécution des premières étapes du programme de mort neuronale ne nécessite pas l'activation d'un programme génétique nouveau. Il est déclenché par des facteurs préexistants, exprimés à partir d'un pool de messagers présents dans le neurone dans des conditions de survie [22]. Ces phénomènes précoces peuvent activer des voies de transmission de signaux aboutissant à l'induction spécifique de gènes qui participent à l'étape d'exécution de l'apoptose. On sait par exemple que l'expression d'un gène appartenant à la famille des caspases responsable du clivage de l'ADN, la protéase CPP32, est sélectivement induite au cours de la déplétion potassique dans les neurones en grain [23].

La notion d'apoptose comme expression d'un programme génétique peut donc être définie de manière plus précise. L'apoptose reposerait sur l'induction spécifique des produits de gènes exécuteurs. Cette étape apparaît tardivement dans la mort neuronale et se manifeste par des critères morphologiques et biochimiques précis: fragmentation de l'ADN, fractionnement cellulaire, dérégulation de l'activité mitochondriale... Cependant, nos résultats montrent que les gènes contrôlant les étapes précoces de transmission des signaux apoptotiques sont constitutivement exprimés et nécessitent que leurs produits soient dégradés en permanence dans les conditions de survie. Le patrimoine cellulaire des neurones les conduit, en cas de rupture des conditions favorisant leur survie, à exécuter immédiatement le programme pré-existant d'apoptose. L'apoptose peut donc être considérée comme un trait phénotypique latent du neurone différencié, exprimé par défaut en l'absence de signaux neurotrophiques. Cette observation surprenante rejoint également les travaux de Jacobson *et al.* [22] qui établissent que l'apoptose peut apparaître dans

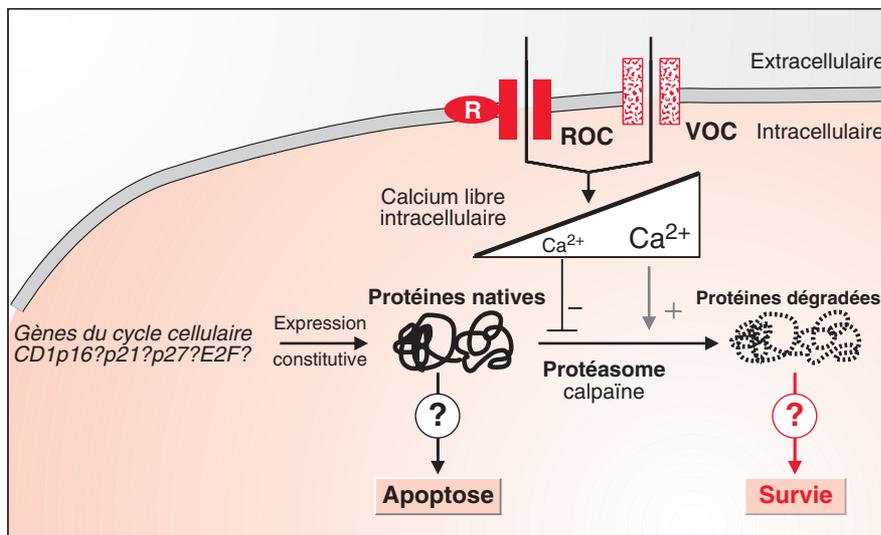


Figure 4. **La dépolarisation et les entrées calciques règlent l'accumulation de cycline D1 et l'apoptose neuronale. Modèle proposé.** Dans ce modèle, les gènes contrôlant le programme de mort neuronale sont constitutivement synthétisés et dégradés. L'état de dépolarisation responsable des entrées de calcium par des canaux dépendants du potentiel (VOC) ou associés à des récepteurs membranaires (ROC, par exemple le récepteur NMDA) contrôle la fonction du protéasome. Dans les conditions dans lesquelles la dépolarisation favorise les entrées de calcium, la dégradation permanente des protéines du cycle cellulaire favorise la survie. Toute dérégulation de ce système induit une accumulation de ces protéines et l'induction du programme de mort neuronale.

des cellules anucléées donc inaptes à exprimer un programme génétique spécifique et nouveau.

A l'avenir, il sera fondamental de comprendre si et comment des facteurs neuroprotecteurs (dépolariation et entrées calciques, neurotrophines) peuvent constitutivement maintenir élevée l'activité des systèmes de dégradation protéique (protéasome mais aussi calpaïne) impliqués dans la survie neuronale. L'analyse du contrôle de leur activité permettra également d'éclairer la fonction et la régulation des protéines du cycle cellulaire dans un neurone différencié ■

Remerciements

Nous remercions vivement B. Canguilhem pour la lecture critique de ce manuscrit. Nos travaux sont soutenus par l'ARC, l'AFM et la région Alsace.

Pascal Kienlen-Campard

Doctorant, allocataire MESR.

Anne-Laurence Boutillier

Chargée de recherche au Cnrs.

Jean-Philippe Loeffler

Directeur de recherche à l'Inserm
UMR Cnrs 7519, 21, rue René-Descartes,
67084 Strasbourg Cedex, France.

RÉFÉRENCES

1. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
2. Galli C, Meucci O, Scorziello A, Werge TM, Calissano P, Schettini G. Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high

KCl, Forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J Neurosci* 1995; 15: 1172-9.

3. Schulz JB, Weller M, Klockgether T. Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *J Neurosci* 1996; 16: 4696-706.

4. Evan GI, Wyllie AZH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992; 69: 119-28.

5. Watson A, Eilers A, Lallemand D, Kyriakis J, Rubinn LL, Ham J. Phosphorylation of c-jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 1998; 18: 751-62.

6. Freeman RS, Estus S, Johnson Jr EM. Analysis of cell cycle-related gene expression in post-mitotic neurons: selective induction of cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron* 1994; 12: 343-55.

7. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994; 79: 551-5.

8. Harper JW, Elledge SJ. The role of Cdk7 in CAK function, a retro-retrospective. *Genes Dev* 1998; 12: 285-9.

9. Kranenburg O, Van der Erb AL, Zantema A. Cyclin D1 is an essential mediator of apoptotic neuronal cell death. *EMBO J* 1996; 15: 46-54.

10. Serrano M, Hanno G, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/Cdk4. *Nature* 1993; 36, 6: 704-7.

11. Boutillier AL, Kienlen Campard P, Loeffler JP. Depolarization regulates cyclin D1 degradation and neuronal apoptosis: a hypothesis about the role of the ubiquitin/proteasome signaling pathway. *Eur J Neurosci* 1999 (sous presse).

12. Gallo V, Kingsbury A, Balázs R, Jørgensen OS. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* 1987; 7: 2203-13.

13. D'Mello SR, Galli C, Ciotti T, Calissano P. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP? *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10989-93.

14. Koike T, Martin DP, Johnson EM Jr. Role of Ca²⁺ channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced by trophic-factor deprivation: evidence that the levels of internal Ca²⁺ determine nerve growth factor dependence of sympathetic ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6421-5.

15. Kienlen Campard P, Crochemore C, René F, Monnier D, Koch B, Loeffler JP. PACAP type I receptor promotes cerebellar neuron survival through the cAMP/PKA signaling pathway. *DNA Cell Biol* 1997; 16: 323-33.

16. Miller TM, Johnson Jr EM. Metabolic and Genetic analysis of apoptosis in potassium/serum deprived rat cerebellar granule cells. *J Neurosci* 1996; 16: 7487-95.

17. Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VEA, Longthorne VL, Culhane AC, Williams GT. Apoptosis: a molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 1996; 236: 1-26.

18. Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1997; 11: 957-72.

19. Hershko A. Roles of the ubiquitin-mediated proteolysis in the cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 788-99.

20. Rock KL, Gramm L, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994; 78: 761-71.

21. Bredesen DE. Neural apoptosis. *Ann Neurol* 1995; 38: 839-51.

22. Jacobson MD, Burne JF, Raff MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J* 1994; 13: 1899-910.

23. Ni B, Xinh W, Yansheng D, Yuan S, Hamilton-Byrd E, Rockey PK, Rosteck Jr P, Poirier GG, Paul SM. Cloning and expression of a rat brain Interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-related protease (IRP) and its possible role in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 1997; 17: 1561-9.

TIRÉS À PART

P. Kienlen-Campard.