

De nouveaux substrats de la protéine kinase Akt impliqués dans l'apoptose : les facteurs de transcription de la famille Forkhead

La mort cellulaire programmée ou apoptose est un processus fondamental au cours du développement normal des organismes pluricellulaires. A titre d'exemple, la moitié des neurones produits au cours de la neurogenèse des mammifères meurent par apoptose. Le processus apoptotique joue également un rôle crucial dans certains processus pathologiques, comme les maladies neurodégénératives ou le développement tumoral. Les membres de la famille de Bcl-2 et une cascade de protéases à activité cystéine nommées caspases sont des effecteurs principaux de la machinerie apoptotique, présente dans toutes les cellules [1]. Certains stimulus apoptotiques activent la machinerie apoptotique directement, sans l'intervention d'une néo-synthèse protéique. En revanche, d'autres stimulus apoptotiques comme un sevrage en facteurs de survie requièrent l'induction de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques. Une voie de signalisation essentielle à la suppression de l'apoptose est la voie PI3K/Akt (*m/s* 1997, n° 4, p. 608) [2]. Cette voie est activée en réponse aux facteurs de croissance et de survie. Ceux-ci, en se liant à leurs récepteurs membranaires, provoquent l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), ce qui conduit finalement à l'activation de la sérine/thréonine kinase Akt (également nommée protéine kinase B). Akt phosphoryle de façon directe deux membres de la machinerie apoptotique : la caspase 9 et BAD, une protéine de la famille de Bcl-2

(*m/s* 1998, n° 1, p. 61). Dans les deux cas, la phosphorylation réprime la fonction pro-apoptotique de ces molécules, ce qui explique, au moins partiellement, l'effet de survie déclenché par Akt.

Akt pouvait également agir en réprimant l'expression de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques. Une information déterminante sur le type de facteurs de transcription potentiellement contrôlés par Akt a été fournie par des études génétiques menées chez *Caenorhabditis elegans*. Un crible génétique chez cet organisme a en effet permis l'identification d'un facteur de transcription dont la fonction était inhibée par la voie PI3K/Akt [3, 4]. Ce facteur de transcription, nommé DAF16, appartient à la famille «Forkhead». Trois orthologues de DAF16 sont connus chez l'homme : FKHR, FKHRL1 (aussi nommé AF6q21) et AFX [5-8]. Ces isoformes ont toutes été identifiées parce qu'elles sont impliquées dans des réarrangements chromosomiques observés au cours d'hémopathies ou de tumeurs solides (rhabdomyosarcomes). Ces trois isoformes, tout comme DAF16 chez le nématode, possèdent des sites consensus de phosphorylation conservés pour Akt (RXRXXS/T).

Plusieurs études dans les cellules de mammifères ont récemment permis de montrer que Akt phosphorylait directement les trois facteurs de transcription FKHRL1, FKHR et AFX, *in vitro* et *in vivo*, et ont identifié les sites de phosphorylation [9-11]. La voie PI3K/Akt est nécessaire

et suffisante pour la phosphorylation de ces trois isoformes dans les cellules. Par ailleurs, la forme endogène de FKHRL1 est détectable dans les fibroblastes ou dans les neurones et est phosphorylée en réponse aux facteurs de survie comme l'IGF-I, et ce par l'intermédiaire de la voie PI3K [9].

La conséquence majeure de la phosphorylation de FKHRL1 par Akt est la modification de sa localisation subcellulaire [9]. Sous forme phosphorylée FKHRL1 est présent dans le cytoplasme. Comme la forme phosphorylée de FKHRL1 interagit avec les protéines 14-3-3, ces dernières pourraient servir à séquestrer FKHRL1 dans le cytoplasme [9]. En revanche, sous forme non phosphorylée, FKHRL1 est localisée dans le noyau. Un mutant de FKHRL1, dans lequel les trois sites de phosphorylation ont été remplacés par des alanines, reste intranucléaire même en présence de facteurs de croissance, ce qui indique que la localisation subcellulaire de FKHRL1 est directement liée aux événements de phosphorylation contrôlés par Akt.

Des études réalisées avec un gène rapporteur contrôlé par un élément de liaison à l'ADN de type Forkhead indiquent que FKHRL1, tout comme AFX ou FKHR, est un activateur de la transcription [9, 10, 12]. L'activation transcriptionnelle de ces trois facteurs de transcription est fortement réprimée lorsqu'une forme constitutivement active de Akt est exprimée dans les cellules. Akt, en phosphorylant les membres de la famille For-

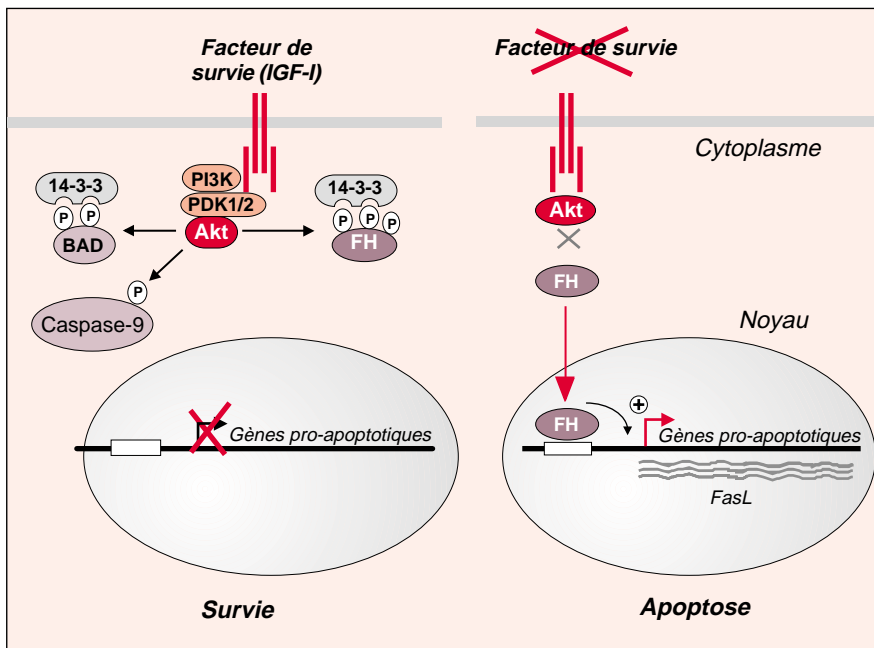


Figure 1. **Régulation des facteurs de transcription de la famille Forkhead par Akt.** En présence de facteurs de survie, la voie PI3K/Akt est activée et Akt phosphoryle plusieurs substrats, tels que BAD et la caspase 9. Akt phosphoryle également les facteurs de transcription de la famille Forkhead (FH) comme FKHRL1 et induit l'interaction de FKHRL1 avec les protéines 14-3-3, protéines qui empêchent son entrée dans le noyau. En l'absence de facteurs de survie, la voie PI3K/Akt est inactive. FKHRL1, sous forme non-phosphorylée, est alors relocalisé dans le noyau, où il se lie à l'ADN et active la transcription des gènes cibles, comme le gène codant pour FasL. FasL, en se fixant sur son récepteur, participerait à la propagation du processus apoptotique. FH: facteur de transcription de la famille Forkhead.

khead, provoquerait donc leur rétention cytoplasmique et empêcherait d'induire la transcription de gènes cibles.

Quel est le lien entre les facteurs de transcription de type Forkhead et la mort cellulaire programmée? Le gène codant pour le ligand du récepteur Fas (FasL) contient dans sa région promotrice trois sites de liaison pour FKHRL1 (*m/s* 1998, n° 4, p. 511). Il était donc tentant de faire l'hypothèse selon laquelle FKHRL1 pouvait induire l'expression du gène codant pour FasL, et que FasL, en se liant au récepteur Fas présent à la surface des cellules déclencherait l'activation d'une cascade de caspases et provoquerait ainsi la mort cellulaire. Une forme mutée de FKHRL1 qui ne peut pas être phosphorylée par Akt, et donc présente de manière

permanente dans le noyau, provoque l'apoptose de plusieurs types cellulaires comme les neurones du cervelet, les lymphocytes Jurkat ou les fibroblastes [9]. Cette apoptose est inhibée lorsque les cellules sont au préalable traitées avec un leurre de FasL ou lorsque ce mutant FKHRL1 est exprimé dans des cellules incapables d'activer la voie de transmission du signal induit par Fas/FasL [9].

Cette série de résultats suggère qu'un des rôles majeurs d'Akt pourrait être de phosphoryler FKHRL1 et de le séquestrer dans le cytoplasme, l'empêchant ainsi d'activer l'expression de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques comme FasL. Comme Akt contrôle également d'autres processus biologiques tels que la prolifération cellulaire ou cer-

taines régulations métaboliques, il sera intéressant de déterminer si les facteurs de transcription de la famille de Forkhead jouent également un rôle clé dans ces réponses biologiques et d'identifier les gènes cibles impliqués.

Anne Brunet

Division of neurosciences, Children's Hospital and Department of Neurobiology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, États-Unis.

1. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-9.
2. Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 262-7.
3. Lin K, Dorman JB, Rodan A, Kenyon C. daf-16: an HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 1997; 278: 1319-22.
4. Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, et al. The Forkhead transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 1997; 389: 994-9.
5. Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, et al. Fusion of a forkhead domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet* 1993; 5: 230-5.
6. Hillion J, Le Coniat M, Jonveaux P, Berger R, Bernard OA. AF6q21, a novel partner of the MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily. *Blood* 1997; 90: 3714-7.
7. Anderson MJ, Viars CS, Czekay S, Cavenee WK, Arden KC. Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHL-like gene subfamily. *Genomics* 1998; 47: 187-99.
8. Borkhardt A, Repp R, Haas OA, et al. Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene* 1997; 14: 195-202.
9. Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96: 857-68.
10. Kops GJPL, de Uiter ND, De Vries-Smits AMM, Powell DR, Bos JL, Burgering BMT. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 1999; 398: 630-4.
11. Rena G, Guo S, Cichy S, Unterman TG, Cohen P. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem* 1999; 274: 17179-83.
12. Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P, Unterman T. Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on IGF binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem* 1999; 274: 17184-92.