

## PP1 et PP2A, des sérine/thréonine phosphatases au cœur de l'apoptose

L'étude des mécanismes qui contrôlent la survie et la mort cellulaire programmée, ou apoptose, permet une meilleure compréhension de notre développement et de certaines pathologies, infectieuses ou cancéreuses. Les protéines phosphatases sérine/thréonine de type 1 (PP1) et de type 2A (PP2A) ont été impliquées dans le contrôle de nombreux processus biologiques. Des travaux récents permettent de mieux appréhender une nouvelle fonction de ces enzymes : le contrôle de l'apoptose par la modification de l'activité des protéines de la famille Bcl-2.

Une vingtaine de protéines de cette famille ont été identifiées, certaines sont anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL...), d'autres pro-apoptotiques (Bad, Bax, Bak...). On savait que l'équilibre entre les membres pro- et anti-apoptotiques suffit à déterminer la sensibilité de la cellule à l'apoptose, car ces protéines s'antagonisent mutuellement en formant des hétérodimères inactifs [1]. Plus récemment, il a été montré que des phosphorylations pouvaient aussi contrôler la fonction des protéines de la famille Bcl-2, et l'on a ainsi pu caractériser des voies de signalisation anti-apoptotiques activées par de nombreux facteurs de croissance qui impliquent la phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K), la kinase Akt (aussi appelée PKB ou RAC-PKB) ou des kinases activées en aval de la voie Ras. En particulier, il a été bien établi qu'en réponse à l'interleukine-3 (IL-3), une cytokine qui active la prolifération et inhibe l'apoptose de précurseurs de lignées hématopoïétiques, la phosphorylation de Bad sur des résidus sérine (112 et 136) permet son association avec les protéines chaperons de la famille 14-3-3. Cette asso-

ciation titre Bad et prévient son action pro-apoptotique [2]. Si la phosphorylation des protéines de la famille Bcl-2 peut modifier leur fonction, on pouvait aisément imaginer que des phosphatases soient aussi impliquées dans le contrôle de leur fonction.

### PP1 $\alpha$ , une nouvelle phosphatase contrôlée par Ras agissant sur Bad et Bcl-2

Les PP1 forment une famille de plusieurs holoenzymes d'expression ubi-

quiste. Elles sont produites par l'interaction spécifique de sous-unités catalytiques (dont il existe quatre isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2) et de sous-unités régulatrices qui sont impliquées dans le ciblage et la modulation de l'activité phosphatase [3]. Dans une lignée lymphocytaire T murine, la lignée TS1  $\alpha\beta$ , dont la survie dépend de l'IL-2 [4], le retrait de cette cytokine provoque l'arrêt de la prolifération et l'apoptose des cellules. Cet effet est associé à la déphosphorylation de Bad sur ses deux sérines 112 et 136. Le traite-

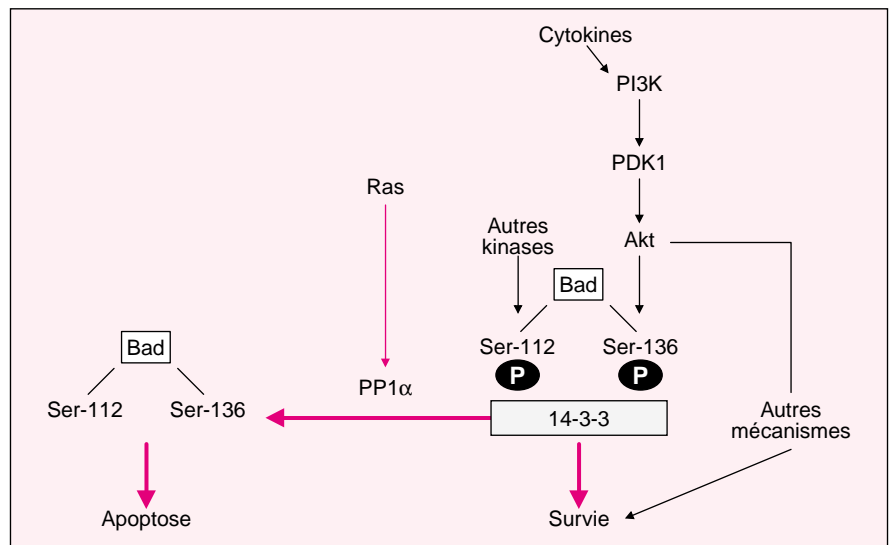


Figure 1. **PP1, une nouvelle phosphatase qui contrôle la survie des cellules.** Les facteurs de survie provoquent l'activation de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) et de la protéine kinase Akt. Cette dernière provoque notamment la phosphorylation de la sérine 136 de la protéine pro-apoptotique Bad. Il est bien établi que la phosphorylation des sérines 112 et 136 de Bad entraîne sa liaison avec la protéine cytosolique 14-3-3 ce qui inhibe sa fonction pro-apoptotique [2]. Dans une lignée de lymphocytes T, l'absence de cytokines provoque l'activation de la phosphatase PP1 $\alpha$  qui provoque la déphosphorylation des deux sérines 112 et 116 de Bad, permettant son action apoptotique. Cette activité « Bad-phosphatase » est par ailleurs activée par Ras [5].

ment par l'acide okadaïque, un inhibiteur des phosphatases PP1 et PP2A, bloque la déphosphorylation de Bad et prévient l'apoptose des cellules. En outre, seule PP1 $\alpha$  (et non PP2A) interagit physiquement avec Bad, ce qui indique que PP1 $\alpha$  est la phosphatase qui provoque la déphosphorylation de Bad [5] (figure 1).

De façon beaucoup plus surprenante, différentes approches (double hybride dans le système levure, co-immunoprécipitations) nous ont permis de montrer que la phosphatase PP1 $\alpha$  interagit aussi avec la protéine Bcl-2 [6]. Cette interaction s'effectue par l'intermédiaire d'une séquence qui contient un motif consensus du type R/K X V/I X F présent dans le site de liaison de nombreuses protéines régulatrices qui interagissent avec PP1 $\alpha$  [7]. En fait, les trois protéines, Bad, Bcl-2 et PP1 $\alpha$  forment un complexe qui possède une activité phosphatase, et peut ainsi être défini comme une nouvelle holoenzyme de PP1 que nous avons appelée « Bad phosphatase » [6]. En outre, Bcl-2 semble jouer le rôle de « sous-unité régulatrice » de PP1 $\alpha$ : si l'on empêche son interaction avec PP1, on observe une diminution de la formation du complexe Bcl-2-Bad-PP1 $\alpha$ , et une diminution de l'activité « Bad phosphatase ». Enfin, si les cellules TS1 $\alpha\beta$  sont sevrées d'IL-2, l'activité « Bad phosphatase » liée à ce complexe augmente, un effet qui semble dû à l'activation de Ras [5]. On sait que les différentes isoformes des GTPases de la famille Ras sont impliquées dans le contrôle soit de la survie, soit de l'apoptose. Ces effets opposés de Ras sur la survie des cellules dépendent du type cellulaire, de l'isoforme impliquée, et des multiples voies de signalisation qui sont activées par Ras. Ainsi, dans la lignée lymphocytaire TS1 $\alpha\beta$ , Ras contrôle positivement la survie des cellules en présence d'IL-2 par l'intermédiaire de la voie de signalisation PI3K/Akt. Inversement, en l'absence de cytokines, Ras peut favoriser l'apoptose des cellules en inhibant, de façon indirecte, l'expression de Bcl-2 [8]. Il apparaît donc qu'une seconde voie par laquelle Ras promeut l'apoptose de ces cellules est l'activation de la « Bad phosphatase » PP1 $\alpha$ , permet-

tant ainsi la déphosphorylation de Bad. Enfin, il faut souligner que d'autres protéines anti-apoptotiques, notamment Bcl-xL ou Bcl-w, contiennent aussi le motif consensus d'interaction avec PP1 $\alpha$  et pourraient donc, tout comme Bcl-2, être de nouvelles protéines de régulation de PP1 $\alpha$ .

### PP2A, une phosphatase qui contrôle Akt et Bcl-2

Plusieurs protéines impliquées dans la survie des cellules sont des substrats d'une autre sérine/thréonine protéine phosphatase, la phosphatase PP2A. Tout d'abord Akt, dont la déphosphorylation par PP2A inhibe l'activité, ce qui inactive la voie de signalisation anti-apoptotique dépendante de la PI3-K [9]. Mais aussi Bcl-2, dont on sait que la phosphorylation sur plusieurs résidus sérine, dont la Ser-70, contrôle de façon positive son activité anti-apoptotique [10, 11]. Or, PP2A peut s'associer de façon transitoire à Bcl-2, provoquer la déphosphorylation de la Ser-70, et inhiber sa fonction anti-apoptotique [12]. Enfin, la phosphatase PP1 $\alpha$  elle-même, dont l'activité est inhibée par la phosphorylation du résidu Thr 320 [13], pourrait être un troisième substrat de PP2A.

La possibilité que Bcl-2, PP1 $\alpha$  et Bad s'associent pour former un complexe dont l'activité Bad phosphatase est accrue pendant l'apoptose permet d'envisager que cette activité phosphatase soit contrôlée positivement par PP2A, grâce à son interaction avec Bcl-2 et/ou PP1 $\alpha$  (figure 2). PP2A se révélerait ainsi une enzyme clé dans le contrôle de l'apoptose en modulant l'activité de kinases comme Akt ou d'autres phosphatases comme PP1 $\alpha$ /Bcl-2/Bad.

### Remerciements

Nos travaux actuels, qui concernent l'étude des phosphatases et des protéines Bcl-2 dans les lymphocytes transformés par Theileria, sont financés par l'ARC (contrats 9449), ainsi que par l'Institut Pasteur (PTR n° 60) le Cnrs et l'INRA.

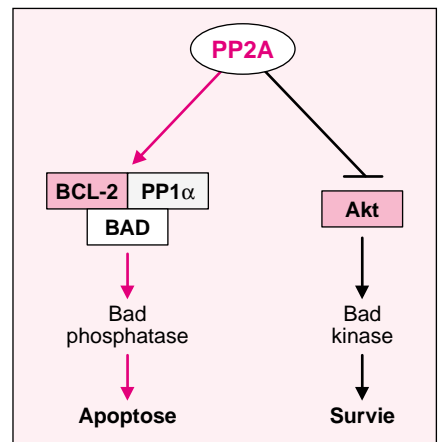


Figure 2. **Modèle hypothétique de contrôle de l'apoptose par PP2A.** Un des substrats de la phosphatase PP2A est la protéine-kinase Akt dont elle inhibe l'activité. De même, la déphosphorylation de Bcl-2 par PP2A inhibe son activité anti-apoptotique. En revanche, la phosphatase PP1 $\alpha$  serait activable par PP2A. Le modèle présenté ici propose un rôle clé de PP2A dans l'apoptose, d'une part en inhibant l'activité Bad kinase d'Akt, et d'autre part en activant l'activité Bad phosphatase du complexe formé par les protéines Bad-Bcl-2-PP1 $\alpha$ . Dans ce complexe, Bcl-2 semble jouer le rôle de sous-unité régulatrice de la phosphatase PP1 $\alpha$ , et les cibles de PP2A pourraient être soit Bcl-2, soit PP1 $\alpha$ , soit les deux.

- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-19.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jocker J, Korsmeyer S. Serine phosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-x. *Cell* 1996; 87: 619-28.
- Hubbard MJ, Cohen P. On target with new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci* 1993; 18: 172-7.
- Pitton C, Rebollo A, Van Snick J, Theze J, Garcia A. High affinity and intermediate affinity forms of the IL-2R expressed in an IL-9-dependent murine T cell line deliver proliferative signals via differences in their transduction pathways. *Cytokine* 1993; 5: 362-71.
- Ayllón V, Martínez AC, García A, Cayla X, Rebollo A. Protein phosphatase 1 $\alpha$  is a Ras-activated Bad phosphatase that regulates IL-2 deprivation-induced apoptosis. *EMBO J* 2000; 19: 2237-46.
- Ayllón V, Cayla X, García A, et al. Bcl-2 targets protein phosphatase 1 $\alpha$  to Bad. *J Immunol* 2001; 166: 7345-52.

7. Eglhoff MP, Johnson DJ, Moorhead G, Cohen PTW, Cohen P, Barford D. Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J* 1997; 16: 1876-87.
8. Romero F, Martinez CM, Camonis J, Rebollo A. Aiolos transcription factor controls cell death in T cells by regulating Bcl-2 expression and its cellular localisation. *EMBO J* 1999; 18: 3419-30.
9. Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 186-91.
10. May WS, Tyler PG, Ito T, Armstrong DK, Qashtsha A, Davidson NE. Interleukin-3 and bryostatins mediate hyperphosphorylation of Bcl-2 $\alpha$  in association with suppression of apoptosis. *J Biol Chem* 1994; 269: 26865-70.
11. Ito T, Deng X, Carr B, May WS. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Biol Chem* 1997; 272: 11671-3.
12. Deng X, Ito T, Carr B, Mumby M, May. Reversible phosphorylation of Bcl-2 following IL-3 or Bryostatins 1 is mediated by direct interaction with protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 1998; 273: 34157-63.
13. Dohadwala M, Cruz e Silva EF, Hall FL, et al. Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6408-12.

### Alphonse Garcia

Laboratoire de signalisation immunoparasitaire, Institut Pasteur URA Cnrs 1960 Département d'immunologie, 25, rue du Dr-Roux, 75015 Paris, France.  
email: agarcia@pasteur.fr

### Xavier Cayla

Laboratoire de physiologie de la reproduction Cnrs/Inra, 9, quai Saint-Bernard 75005 Paris France.

### Gordon Langsley

Laboratoire de signalisation immunoparasitaire, Institut Pasteur URA Cnrs 1960 Département d'immunologie, 25, rue du Dr-Roux, 75015 Paris, France.

### Angelita Rebollo

Centro Nacional de Biotecnología, Department of Immunology and Oncology, Campus de Cantoblanco, UAM, 28049 Madrid, Espagne.

## ■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Le transporteur ABC qui expulse le Hoechst, un nouveau marqueur de cellule souche?** Le colorant vital de l'ADN Hoechst 33342, excitable par un rayonnement UV (348 nm) est classiquement utilisé pour mesurer la ploïdie des noyaux. Or, le groupe de R. Mulligan a fait il y a quelques années, fortuitement (erreur de manipulation ?), une observation fort intéressante. Lorsqu'on examine l'émission de fluorescence de cellules marquées par le Ho à deux longueurs d'onde, 424 nm et 660 nm, habituellement utilisées pour détecter l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et la phycoérythrine (PE), on détecte une population négative, très rare, dite *side population* ou SP. La disparition de cette SP après traitement des cellules par le vérapamil, qui bloque l'efflux par des transporteurs de type mdr (*multi-drug resistance*), prouve que ces cellules expulsent le colorant de façon très active. Tout l'intérêt de cette observation vient de ce que ces cellules, isolées de la moelle osseuse chez la souris, étaient très enrichies en cellules souches capables de reconstituer l'ensemble des populations hématopoïétiques à long terme après transplantation à un animal irradié alors même qu'elles sont CD34<sup>-</sup> [1]. Or, on s'est aperçu que d'autres tissus contiennent également une fraction SP, et que celle-ci aurait aussi des caractéristiques de cellules souches. Ainsi, la fraction SP du muscle squelettique contient non seulement des cellules souches musculaires mais également des cellules capables de se différencier en cellules hématopoïétiques après leur greffe à un animal irradié [3]. Chez l'homme, il y a très peu de données : un article publié en octobre 2001 dans *The Journal of Clinical Investigation* confirme que les cellules CD34<sup>+</sup>SP du foie fœtal humain peuvent aussi être qualifiées de cellules souches hématopoïétiques [2], mais il n'en est pas de même de celles du sang de cordon. Si la P-glycopro-

téine (Pgp) codée par le gène *MDR1* (*multidrug resistance*) est exprimée par les progéniteurs hématopoïétiques immatures, sa responsabilité dans l'efflux du Hoechst n'était pas démontrée. Une équipe de Memphis associée à des Japonais nous révèle dans *Nature Medicine* que Pgp n'est pas responsable de l'expulsion du Ho [4], puisque la population SP de la moelle osseuse de souris *Mdr1<sup>-/-</sup>* est intacte. C'est un autre transporteur de la famille ABC, BCRP1 (ou ABCG2) qui expulse le Ho. La démonstration vient de la transcription du gène *bcrp1* dans les cellules de moelle osseuse de souris déplétée de cellules matures, et dans les populations CD34<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>SP, contenant les cellules souches dans le muscle. *bcrp1* paraît spécifique de la population SP. La transduction du cDNA codant pour BCRP1 confère aux cellules médullaires la propriété d'expulser le Hoechst, confirmant son activité fonctionnelle. Curieusement, la surexpression de *bcrp1* inhibe la différenciation hématopoïétique. Une hypothèse séduisante serait la possible déplétion, par l'intermédiaire de BCRP1, de molécules essentielles à la différenciation cellulaire ; un tel mécanisme a été décrit chez *Dictyostelium*. On se demande aujourd'hui si cette propriété d'expulser le colorant Ho ne serait pas un marqueur « universel » de cellule souche, indépendamment de toute spécificité tissulaire, et d'un point de vue pratique, les anticorps reconnaissant le transporteur BCRP1 pourront s'avérer fort utiles. Restons prudents cependant, car les cellules PNA-HSA<sup>-</sup> identifiées comme cellules souches neurales (*m/s* 2001, n° 10, p. 1089) sont Ho (+).

- [1. Goodell MA, et al. *J Exp Med* 1996; 183: 1797-806.]
- [2. Jackson KA, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14482-6.]
- [3. Uchida N, et al. *J Clin Inv* 2001; 108: 1071-7.]
- [4. Zhou S, et al. *Nat Med* 2001; 7: 1028-34.]