

## Rythmes, sénescence et apoptose

*Le contrôle moléculaire des cycles vitaux est une énigme fascinante. Plusieurs travaux portant sur les cycles circadiens chez les insectes, les champignons et les mammifères convergent vers un principe de base, celui d'une horloge moléculaire interne réajustée par l'influence extérieure de l'alternance jour/nuit. L'une des familles de gènes dont l'expression suit un tel rythme circadien est caractérisée par un domaine structural conservé, dénommé PAR. Le même domaine vient d'être identifié dans des gènes semblant impliqués, chez le nématode et les mammifères, dans le contrôle de l'apoptose. Les mécanismes de cette mort programmée peuvent être englobés dans le commentaire général fait sur les voies de transmission des signaux : ils sont, eux aussi, caractérisés par la complexité et l'enchevêtrement ; cependant, un chemin raccourci vient d'être identifié qui mène directement de récepteurs membranaires de la famille de ceux du TNF à une protéase de la famille ICE, par l'intermédiaire d'un adaptateur. Il semble probable que le phénomène global de la sénescence, multifactoriel, ne soit pas indépendant de ces notions de rythme et d'apoptose. Chez le nématode, en tout cas, l'étude génétique démontre l'existence de plusieurs classes de gènes dont l'action influe sur la longévité, certains réglant aussi les rythmes de vie. Parmi les mécanismes de la sénescence, les lésions causées par les radicaux libres sont l'un des mieux étudiés. Un phénomène du même type pourrait expliquer en partie la neurotoxicité du peptide  $\beta$  amyloïde dans la maladie d'Alzheimer.*

## Vivre plus longtemps... et plus lentement

La génétique du vieillissement fait enfin de rapides progrès depuis quelques années, comme nous l'indiquions récemment dans une minisynthèse consacrée à la découverte du gène muté dans le syndrome de Werner [1]. D'autres gènes susceptibles d'influencer la longévité d'organismes divers ont été caractérisés, chez la drosophile, la levure, le nématode *Caenorhabditis elegans*, etc. [1, 2]. Chez ce dernier organisme, il existe plusieurs façons originales de vivre plus longtemps... mais parfois moins intensément. Une première technique est un peu l'équivalent de cet enfant qui, dans le film « Le Tambour » de Volker Schlöndorff, d'après l'œuvre de Gunther Grass, choisissait de ne pas grandir. *Caenorhabditis* connaît ainsi un stade larvaire, auquel il peut se cantonner pendant plusieurs mois en cas d'insuffisance en matière nutritive. Le passage du stade larvaire (*dauer stage*) au stade adulte exige des gènes *daf* dont la mutation peut entraîner un blocage de la transition. Cet organisme bloqué au stade *dauer* a une durée de vie prolongée, qui évoque d'ailleurs plus un état d'hibernation qu'une véritable modulation de la longévité [2]. Cependant, il est possible de dissocier le blocage au stade *dauer* de l'effet sur la longévité grâce à une mutation *daf-2* thermosensible, non apparente à température permissive (15 °C) et apparente à température non permissive (20 °C). Lorsque qu'un tel mutant *daf-2ts* est cultivé à température permissive jusqu'au stade adulte, puis à 20 °C ensuite, l'expression de la mutation *daf-2* entraîne un doublement de la durée de vie sans aucune modification apparente de l'aspect et de l'activité.

Par conséquent, la perte de fonction *daf-2* a deux conséquences relativement indépendantes, le blocage au stade larvaire *dauer* et, chez l'adulte, une augmentation de la longévité. Ces effets pourraient exiger la fonction du gène *daf-16* qui serait normalement contrôlé négativement par *daf-2*: en effet, la longévité des vers *daf-2<sup>-/-</sup>*; *daf-16<sup>-/-</sup>* est normale. Les gènes *clock* (*clk-1*, *clk-2*, *clk-3*) agissent, quant à eux, sur l'intensité de l'activité, et donc différemment des gènes *daf*. Les gènes *clk* semblent contrôler le fonctionnement d'une horloge interne réglant tous les rythmes vitaux, dont la longévité. Les animaux mutants sont ainsi ralentis dans tous les aspects de leur vie et, ont une durée de vie prolongée. Ils se développent, mangent, défèquent, se déplacent plus lentement que les animaux normaux. Lorsque plusieurs mutations *clk* sont combinées entre elles et avec la maturation *daf-2*, la prolongation de la vie peut être considérable, atteignant près de deux mois au lieu de moins de trois semaines normalement. Lakowski et Hekimi (Montréal, Québec, Canada), auteurs de ces travaux, ont également noté que le phénotype ne s'exprimait que chez les animaux mutants issus d'un vers également mutant, ce qui signifie que les gènes *clock* ont un effet maternel [4]. Cette observation est très remarquable car elle signifie qu'une substance maternelle, agissant donc durant la gamétogenèse ou aux tout premiers stades du développement, va pouvoir imprimer durablement les rythmes vitaux de l'animal. Il faut bien reconnaître que la solution *clock* de prolongation de la vie est peu attractive chez l'homme puisque le prix à payer de cette

grande longévité est une vie au ralenti. Ironiquement, cette observation rappelle les travaux provocateurs, également présentés en leur temps dans *médecine/sciences*, selon lesquels la différence moyenne de vie entre les hommes et les femmes n'était pas associée, chez ces dernières, à une différence significative de la vie éveillée; c'est-à-dire que la différence de 10 % entre la longévité des deux sexes correspondait en réalité à une durée moyenne du sommeil de 10 % supérieur chez les femmes par rapport aux hommes (*m/s n° 2, vol. 10, p. 235*).

A.K.

1. Kahn A. Réparation, cancer et sénescence: le gène du syndrome de Werner. *médecine/sciences* 1996; 12: 802-4.
2. Guarente L. Do changes in chromosomes cause aging? *Cell* 1996; 86: 9-12.
3. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type *Nature* 1993; 366: 461-4.
4. Lakowski B, Hekimi S. Determination of life-span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. *Science* 1996; 272: 1010-3.



Colloque coorganisé  
par la Société  
de Pharmacotoxicologie  
Cellulaire (SPTC)  
et la Société Française  
de Toxicologie Génétique (SFTG)

- Xénobiotiques et apoptose
- Transfert de gènes et thérapie génique : Pharmacotoxicologie cellulaire, toxicogénétique et aspects réglementaires

**Société de  
Pharmaco-  
Toxicologie  
Cellulaire**

**6 et 7 mars 1997**

Amphithéâtre Henri Poincaré  
Carré des sciences  
1, rue René-Descartes  
75005 Paris, France

Siège social :  
15, rue de l'École  
de Médecine  
75006 PARIS  
Téléphone :  
01 42 34 68 70  
Télécopie :  
01 44 07 10 52

Renseignements :  
Christiane Hecquet,  
SPTC  
15, rue de l'École  
de Médecine  
75006 Paris, France.  
Tél. : 01 42 34 68 70  
Fax : 01 44 07 10 52

■■■■ **Mécanismes de la neurotoxicité du peptide  $\beta$  amyloïde.** Le peptide  $\beta$  amyloïde provient de la dégradation de son précurseur APP (*amyloid peptide precursor*). Dans la maladie d'Alzheimer, il s'accumule sous une forme insoluble qui semble directement neurotoxique [1]. Récemment, nous avons repris les arguments semblant indiquer que le précurseur APP était, en fait, un récepteur membranaire susceptible d'interagir avec une protéine  $G_0$  (*m/s n° 8-9, vol. 12, p. 980*). Les mutants de ce précurseur APP dans sa forme APP<sub>695</sub> associés à des formes familiales de maladie d'Alzheimer semblent capables d'activer de manière constitutive la protéine  $G_0$ , et se comportent donc comme des mutants avec gain de fonction, ce qui pourrait expliquer la transmission dominante de ces formes familiales. Ce mécanisme d'activation constitutive de  $G_0$  par les mutants APP vient d'être confirmé dans un système *in vitro* de vésicules reconstituées [2]. Cependant, un tel modèle ne rend pas compte de la neurotoxicité antérieurement signalée du peptide  $\beta$  amyloïde. Deux articles viennent de paraître dans le numéro de *Nature* daté du 22 août 1996, qui indiquent que le peptide  $\beta$  amyloïde ( $A\beta$ ), pourrait interagir avec deux types de récepteurs, ce qui contribuerait à produire des radicaux actifs de l'oxygène responsables d'une peroxydation des membranes neuronales, relayant donc la neurotoxicité de  $A\beta$ . Yan *et al.* (New York, USA), montrent que  $A\beta$  peut se fixer aux récepteurs RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) à la surface des neurones, des cellules de la paroi vasculaire et de la microglie [3]. Une telle interaction de  $A\beta$  avec le RAGE de la membrane microgliale est associée à un stress oxydatif. El Khoury *et al.* (New York, USA) démontrent, quant à eux, que  $A\beta$  peut également se fixer sur le récepteur SR (*scavenger receptor*), qui est une molécule macro-

phagique et microgliale qui intervient dans l'endocytose et la dégradation des LDL (*low density lipoprotein*) [4]. Les molécules RAGE et SR n'ont aucune similitude de séquence ni de structure et appartiennent à des familles protéiques différentes: RAGE ressemble un peu aux protéines CAM, et appartient à la superfamille des protéines à domaine immunoglobuline, alors que SR est un récepteur homo-trimérique constitué d'hélices  $\alpha$  de type collagène, avec de nombreux domaines riches en cystéine. Les cellules de la microglie qui appartiennent à la lignée macrophagique, produisent, lorsqu'elles sont stimulées par  $A\beta$ , des radicaux oxygènes et différents types de cytokines, notamment des facteurs de croissance et du TNF- $\alpha$ . Reste à proposer une relation entre les deux mécanismes pathogéniques résumés dans cette nouvelle: une excito-toxicité liée à une mutation activatrice du précurseur APP, et une neurotoxicité secondaire associée à l'accumulation du peptide  $\beta$ -amyloïde. Dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer avec mutation du précurseur APP<sub>695</sub>, l'activation relayée par la protéine  $G_0$  pourrait constituer un mécanisme de base conduisant aux premières lésions et à l'accumulation du peptide  $A\beta$  extracellulaire. Ce dernier pourrait alors perpétuer la neurodégénérescence en stimulant la production de radicaux oxygène délétères par son interaction avec deux types de récepteurs, les RAGE sur les cellules nerveuses et vasculaires et les SR uniquement sur la microglie.

- [1. Octave J, *et al. médecine/sciences* 1995; 11: 1251-9.]
- [2. Okamoto T, *et al. EMBO J* 1996; 15: 3769-77.]
- [3. Yan CD, *et al. Nature* 1996; 392: 685-91.]
- [4. El Khoury J, *et al. Nature* 1996; 382: 716-19.]

■■■ **Le complexe apoptotique : association d'une protéase de la famille ICE au complexe de Fas.**

L'apoptose cellulaire peut être déclenchée par activation de récepteurs tel Fas/APO-1 et le récepteur p55 du TNF (*tumor necrosis factor*) [1]. Ces récepteurs pro-apoptotiques sont associés à des partenaires relativement nombreux; deux partenaires ont été particulièrement bien caractérisés : MORT-1, encore appelé FADD, se fixe à Fas alors que TRADD se fixe au récepteur de type 1 du TNF (*m/s n° 4, vol. 12, p. 541*). Une équipe israélienne a détecté par la méthode du double hybride dans la levure un partenaire de MORT-1/FADD [2]. Parallèlement, une équipe comportant des chercheurs américains et européens de Heidelberg (centre de recherche sur le cancer et EMBL, Allemagne) est, quant à elle, partie de la caractérisation des partenaires du complexe d'action de l'apoptose, appelé DISC (*death-inducing signaling complex*) par une méthode ultramoderne de microséquençage protéique miniaturisé (spectrométrie de masse et *electrospray*) [3]. Apparemment, les deux équipes ont isolé la même protéine, appelée MACH (*MORT-1-associated CED-3 homolog*) par l'équipe israélienne (à noter que *mach* signifie « qui détériore » en hébreu); et FLICE (*FADD-linked ICE*) par la seconde équipe. Cette protéine comporte deux motifs analogues à des domaines MORT-1/FADD et des motifs similaires aux domaines protéases des membres de la famille ICE. La surexpression cellulaire de MACH/FLICE provoque l'apoptose, qui est bloquée par les inhibiteurs de protéase ICE (peptide de synthèse ou protéine CrmA de poxvirus). Plusieurs formes de cette molécule MACH/FLICE existent, engendrées par épissage alternatif. Ces résultats aboutissent au schéma d'une voie relativement simple de transmission d'un signal apoptotique: la liaison des ligands apoptotiques (ligand de Fas et TNF) à leur récepteur entraînerait le recrutement, par l'intermédiaire de

l'adaptateur MORT-1/FADD, d'une protéase de la famille ICE déclenchant la cascade apoptotique. Ce schéma est certainement trop simple puisqu'il ne fait pas intervenir les nombreux agents dont on sait qu'ils sont eux aussi impliqués dans la transmission ou dans la modulation du signal apoptotique: sphingomyélinase, céramide, protéine kinases, protéine phosphatases, etc.

- [1. Martinou J. *médecine/sciences* 1995 ; 11 : 367-73.]
- [2. Bodwin P, *et al. Cell* 1996; 85: 803-15.]
- [3. Muziot M, *et al. Cell* 1996; 85: 817-27.]

■■■ **Action immunosuppressive du ligand de Fas et allogreffe.**

Le ligand de Fas reconnaît son récepteur Fas à la membrane cellulaire, véhiculant un signal apoptotique aboutissant à la mort de la cellule. Les lymphocytes T cytotoxiques expriment à leur surface le ligand de Fas puis, secondairement, le récepteur, ce qui aboutit à leur autodestruction, évitant probablement ainsi la création de lésions tissulaires secondaires à la présence prolongée des cellules cytotoxiques activées [1-3]. Plusieurs équipes ont noté que l'expression par certaines cellules, dans le testicule et l'œil, du ligand de Fas pouvait être à l'origine de l'exceptionnelle tolérance immunologique à la greffe de ces tissus... ou dans ces tissus (*m/s n° 12, vol. 11, p. 1756*) [1, 2]. Le mécanisme de cette tolérance repose sur l'élimination des lymphocytes T cytotoxiques par des cellules exprimant à leur surface le ligand de Fas. C'est en partant de ces prémices qu'une équipe américano-helvétique de Philadelphie et Zurich a essayé de recréer un microenvironnement cellulaire permettant de protéger des cellules allogéniques contre le rejet de greffe. Ces auteurs ont greffé ensemble des îlots de Langerhans et des myoblastes syngéniques préalablement transfectés de

manière stable à l'aide d'un vecteur d'expression pour le ligand de Fas. Dans ces conditions, ces myoblastes sont probablement capables de détruire, grâce à l'activation de la voie Fas, les lymphocytes T activés réagissant contre l'allogreffe [4] dont la survie est ainsi très prolongée.

- [1. Golstein P. *médecine/sciences* 1995; 11: 99-104.]
- [2. Martinou J. *médecine/sciences* 1995 ; 11 : 367-73.]
- [3. Mignon A, Lacronique V. *médecine/sciences* 1996; 12: 84-6.]
- [4. Lau HT, *et al. Science* 1996; 273: 109-12.]

■■■ **Maladie de Huntington et apoptose.**

La chorée de Huntington est une maladie dominante associée à une répétition de triplets codant pour des glutamines dans la région codante du gène de la Huntingtine. La Huntingtine est une protéine ubiquitaire dont la fonction est tout à fait inconnue. La dominance génétique de la maladie et l'observation que des souris dont les deux allèles du gène de Huntingtine ont été invalidés ne présentent pas du tout les mêmes symptômes que ceux de la maladie de Huntington indiquent que le mécanisme pathogénique est probablement un « gain de fonctions ». Différents travaux récents ont attiré l'attention sur les propriétés nouvelles de la Huntingtine dont la répétition de glutamine s'est considérablement accrue du fait de l'amplification du nombre de triplets CAG (*m/s n° 4, vol. 9, p. 488, n° 4, vol. 10, p. 472*). C'est ainsi qu'un anticorps particulier permet de détecter un changement de conformation de la protéine anormale qui, par ailleurs, semble pouvoir contracter des relations de force accrue avec d'autres protéines cellulaires, HAP-1 (*huntingtin-associated protein-1*) (*m/s n° 4, vol. 12, p. 535*) et glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (*m/s n° 6-7, vol. 12,*

p. 852). Goldberg *et al.* associant des chercheurs de Vancouver (Colombie britannique, Canada), Québec (Canada) et du New Jersey (USA) montrent maintenant que la Huntingtine est un substrat possible de la protéase à cystéine appartenant à la famille des ICE (*interleukin-converting enzyme*) [1]. La protéase CPP-32, également appelée apoptase, un équivalent chez les mammifères de la protéase CED-3 de *Caenorhabditis elegans*, clive ainsi beaucoup plus efficacement la Huntingtine anormale avec sa longue répétition de glutamine que la protéine normale. Ainsi, la Huntingtine s'ajoute-t-elle à la liste encore limitée des substrats potentiels reconnus de CPP-32 et des autres protéases de la famille ICE (*m/s n° 11, vol. 11, p. 1758*). Cette observation n'apporte aucun élément décisif quant à la pathogénie de la maladie de Huntington. Cependant, l'intervention très probable de phénomènes apoptotiques au cours de cette maladie et le fait que la Huntingtine soit une cible des protéases apoptotiques pourrait ne pas constituer un hasard. Peut-on penser que l'un des produits de clivage de la Huntingtine anormale serait doté d'une pathogénicité particulière? Ou bien que les protéases apoptotiques pourraient être stimulées par interaction avec la Huntingtine mutée ou l'un de ses produits de dégradation?

[1. Goldberg YP, *et al. Nature Genet* 1996 ; 13 : 442-9.]

■■■■ **Les protéines à domaine PAR, de nouveaux partenaires de l'apoptose.** Parmi les facteurs de transcription, activateurs ou répresseurs, possédant des domaines de dimérisation à glissière de leucine (protéine bZIP), une sous-famille a été isolée sur la base de plus grandes analogies de séquences: les protéines à domaine PAR. Les facteurs DBP (*albumin D-element binding protein*) et TEF (*thyrotropin embryonic fac-*

*tor*), des activateurs transcriptionnels, ainsi que l'inhibiteur E4BP4 sont les premiers membres de cette famille à avoir été caractérisés chez les mammifères. Plus tard, le gène *HLF* (*hepatic leukaemia factor*) a été identifié car impliqué dans un phénomène de translocation chromosomique entre les chromosomes 17 et 19 qui aboutit à la synthèse d'une protéine hybride E2A-HLF dans des leucémies aiguës de type B. Un comportement particulier des protéines PAR, notamment de DBP, avait été observé par l'équipe de Ueli Schibler (Genève, Suisse): leur abondance varie considérablement au cours du cycle nycthéral [1]. Tout à fait indépendamment de ces travaux, le laboratoire du pape de la génétique de *Caenorhabditis elegans*, Robert Horvitz (Cambridge, MA, USA) étudiait, chez son ver préféré, le mécanisme contrôlant la mort par apoptose de deux motoneurons neurosécrétoires sérotoninergiques superflus. Génétiquement, il semblait qu'un gène *ces-2*, contrôlant négativement l'expression d'un gène *ces-1*, était nécessaire à ce phénomène. Le clonage du gène *ces-2* devait démontrer qu'il a le potentiel de coder pour une protéine CES-2 qui appartient manifestement à la famille des facteurs à domaine PAR, assez similaire au produit du gène *HLF* [2]. Dans le numéro de *Nature* qui rapporte ces résultats, une autre équipe nippo-américaine de Memphis (TE), Baltimore (MD) et de Tochigi au Japon, montrait que dans les cellules leucémiques exprimant la protéine hybride E2A-HLF, un mutant négatif dominant en *trans* de ce facteur hybride provoquait l'apoptose des cellules [3]. Ainsi, deux protéines PAR, un activateur (HLF) et, probablement, un inhibiteur (CES-2) semblent impliqués, chez un nématode et chez un mammifère, dans la régulation des phénomènes d'apoptose, qui pourrait être induite par CES-2 et inhibé par HLH. Les protéines de la famille PAR ont, comme d'autres facteurs à domaine de dimérisation comportant une glissière de leucine,

la propriété de former des hétérodimères avec d'autres facteurs PAR. C'est donc toute une famille de protéines multimériques à domaine PAR qui pourrait être impliquée dans la régulation de l'apoptose. Il est d'ailleurs intéressant de rapprocher ce rôle éventuel des protéines PAR dans la régulation de l'apoptose du comportement cyclique de l'expression du gène *DBP*, l'élément commun étant ici le facteur temps, au cours du développement ou du nycthémère [4].

[1. Falvey E, *et al. EMBO J* 1995; 14: 4307-17.]

[2. Metzstein MM, *et al. Nature* 1996; 382 : 545-7.]

[3. Inaba T, *et al. Nature* 1996; 382 : 541-4.]

[4. Thompson CD. *Nature* 1996; 382 : 492-3.]

## 14<sup>e</sup> CONFÉRENCE ANNUELLE SUR L'OBÉSITÉ

L'AFERO (Association Française d'Études et de Recherches sur l'Obésité) dont l'objet est de promouvoir les échanges scientifiques, la diffusion des connaissances et la formation dans le domaine de la recherche biomédicale sur l'obésité, organise sa 14<sup>e</sup> conférence annuelle

**Les 13 et 14 décembre 1996**  
à Strasbourg

École Nationale d'Administration (ENA)  
1, rue Sainte-Marguerite  
67000 Strasbourg, France.

Pour tous renseignements :

s'adresser au Secrétariat Général  
de l'AFERO : Mme Quignard-Boulangé,  
Inserm U. 177,

Institut Biomédical des Cordeliers,  
15, rue de l'École-de-Médecine,  
75270 Paris Cedex 06, France.

Tél. : 01 43 29 29 22/23/24  
Fax : 01 40 51 85 86