

Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose : un enjeu thérapeutique pour demain ?

**Alexandre Mignon
Nicolas Rouquet
Virginie Joulin**

L'apoptose, inhibée ou suractivée, est impliquée dans la pathogénie de maladies aussi différentes que les néoplasies, les maladies neurodégénératives, le SIDA, les hépatites, ou l'infarctus du myocarde. Induits par de nombreux signaux différents, intra- ou extracellulaires, les processus apoptotiques aboutissent à l'activation d'un effecteur commun, les caspases, protéases à cystéine de la famille de l'*interleukin-1 converting enzyme* (ICE). Les caspases clivent leurs substrats protéiques à des sites contenant un résidu aspartate, engageant ainsi la phase terminale et irréversible de l'apoptose. La connaissance de leurs gènes, la caractérisation de leur mode d'action et d'activation, de leurs spécificités cellulaires et de substrats, et la récente découverte d'inhibiteurs moléculaires naturels et synthétiques créent un enjeu scientifique et thérapeutique pour demain : celui d'une meilleure compréhension et de nouveaux traitements d'affections humaines caractérisées dans leur physiopathogénie par un dysfonctionnement ou le déclenchement inapproprié de processus apoptotiques.

ADRESSES

A. Mignon : *docteur en médecine, interne des hôpitaux de Paris, poste d'accueil*. Inserm U.129, ICGM, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France. N. Rouquet : *docteur ès sciences*. V. Joulin : *docteur ès sciences*. Inserm U. 380, ICGM, 22, rue Méchain, 75014 Paris, France.

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, joue un rôle déterminant au cours de processus physiologiques aussi différents que le développement, le fonctionnement et l'homéostasie du système immunitaire, le contrôle des tissus hormono-dépendants ou du renouvellement cellulaire [1]. A la phase descriptive de la fin des années 1970, établissant les caractéristiques morphologiques de l'apoptose (condensation du cytoplasme, formation de protubérences

au niveau de la membrane plasmique, condensation de la chromatine nucléaire en périphérie du noyau et fragmentation internucléosomique de l'ADN), a fait suite la phase moléculaire du début des années 1990, avec la caractérisation rapide des gènes et des protéines impliqués dans cette mort cellulaire très conservée à travers les espèces [2, 3]. De nombreux signaux très différents, physiologiques comme pathologiques, intra- comme extra-cellulaires ont été identifiés comme

pouvant déclencher des processus apoptotiques. Ainsi, la privation en facteurs de croissance, le traitement par des substances cytotoxiques ou des glucocorticoïdes, la protéine p53, le TNF α ou encore des agents agonistes de la voie de Fas peuvent induire l'apoptose dans de très nombreux types cellulaires [4]. En dépit de la diversité de ces multiples signaux inducteurs, toutes les cellules engagées dans le processus apoptotique montrent, de façon spectaculaire, des modifications morphologiques et biochimiques similaires, suggérant l'existence d'une phase effectrice commune à tous les types cellulaires: tous ces signaux aboutissent *in fine* à l'activation irréversible d'un tronc commun (figure 1), constitué par des protéases à cystéine appelées caspases [5], et orchestré par la mitochondrie (*m/s n° 5, vol. 13, p. 738*) [6]. Dans cette revue ne seront abordées que les caspases, le rôle de la mitochondrie largement mis en avant par de multiples travaux récents [7] (*voir p. 18 et p. 54 de ce numéro*) n'étant décrit que brièvement au sujet des interactions existant entre caspases et mitochondrie. L'enthousiasme scientifique et l'intérêt croissant des chercheurs et cliniciens est justifié par la rapide identification de ces protéases, ainsi que les perspectives de pouvoir en moduler l'activité grâce à des inhibiteurs peptidiques. Elles sont activées au cours de très nombreuses affections humaines caractérisées dans leur physiopathogénie par un dysfonctionnement de l'apoptose, ou la survenue inappropriée d'une apoptose normale [8]. La liste des maladies humaines concernées dans leur physiopathogénie par des processus apoptotiques inefficaces, déréglés ou suractivés s'allonge continuellement, intéressant des domaines aussi divers que les maladies neurodégénératives, les néoplasies, les hépatites, les cardiopathies ischémiques ou dégénératives, ou l'infection à VIH, entre autres [9]. Dans cette revue, nous décrirons principalement la famille des protéases à cystéine de la famille ICE, les caspases, et ouvrirons sur les perspectives thérapeutiques de modulation de leur activité, en insistant particulièrement sur deux situations pathologiques: l'infarctus du myocarde et les hépatites aiguës.

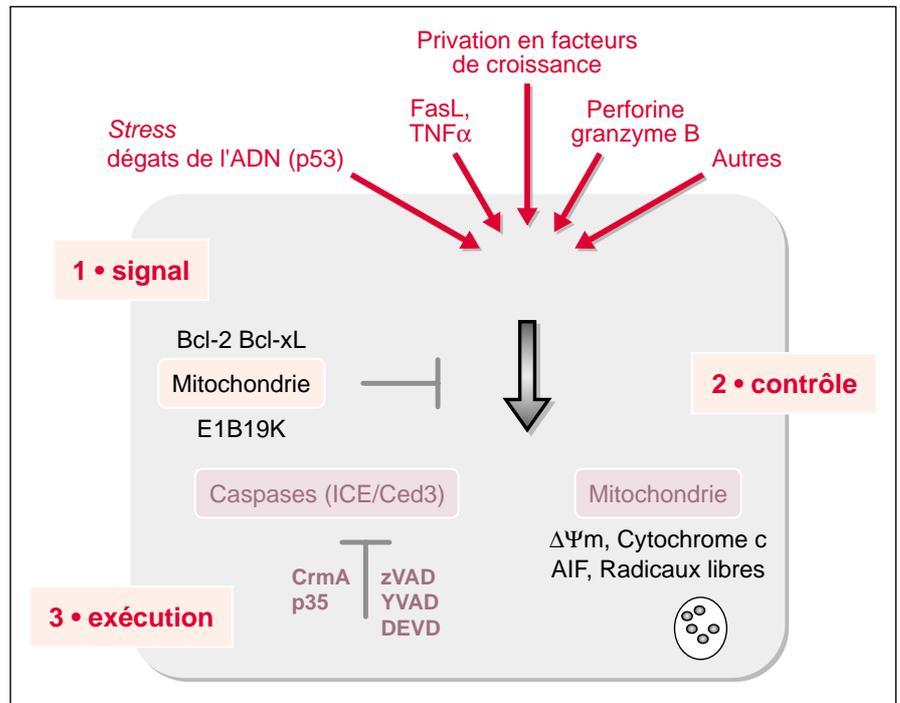


Figure 1. **Modélisation du processus apoptotique en trois phases: déclenchement du signal apoptotique, contrôle, et exécution.** Les éléments déclenchants sont indiqués en rouge. La mitochondrie et les protéines de la famille Bcl-2 sont impliquées dans le contrôle; la mitochondrie est, en outre, impliquée dans la phase d'exécution: sa perméabilité membranaire augmente et elle libère dans le cytoplasme des facteurs qui vont déclencher l'activation des caspases (cytochrome c, AIF apoptosis inducing factor). Les possibilités d'inhibition se situent clairement: (1) au niveau du contrôle, avec la famille des protéines Bcl-2; (2) au niveau des caspases, avec des peptides synthétiques zVAD, YVAD ou DEVD, qui bloquent leur activité protéasique par compétition. E1B19K: protéine anti-apoptotique de l'adénovirus, analogue de Bcl-2; $\Delta\Psi_m$: potentiel transmembranaire de la mitochondrie; p35 et CrmA: protéines virales inhibitrices des caspases par liaison et blocage compétitif sur leur site protéolytique actif.

Les caspases: effecteur ultime et principal de toutes les voies de transduction d'un signal apoptotique

L'apoptose est un mécanisme essentiel au cours du développement des espèces, des plus simples au plus complexes. Ce caractère remarquablement conservé au cours de l'évolution a permis, en particulier par l'étude du développement d'un petit nématode, *Caenorhabditis elegans*, d'identifier une famille de gènes codant pour des protéases à cystéine, désormais regroupées sous le terme générique de caspases, représentant les effecteurs de la mort cellulaire apoptotique [10]. Au cours du développement de *C. elegans*, 131 cellules disparaissent par un

processus ayant toutes les caractéristiques de l'apoptose [10]. Trois gènes clés, *ced-3*, *ced-4* et *ced-9* sont impliqués dans la mort ou la survie de ces 131 cellules (figure 2). L'analyse de mutants du gène *ced-9* a permis de définir son rôle: celui de prévenir l'apoptose des cellules devant survivre. Le clonage de *ced-9* a révélé une homologie de séquence de son produit avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2, connue chez l'homme depuis 1985 pour sa surexpression dans les lymphomes folliculaires de type B avec translocation t(14,18), et identifiée depuis comme le membre fondateur d'une grande et sans cesse croissante famille de protéines aux propriétés anti- et pro-apoptotiques [11]. De façon spectaculaire, *BCL-2* exprimé chez le nématode, ou *ced-9* dans des cellules n'exprimant pas

BCL-2, conservent leurs propriétés, fournissant la preuve de l'analogie structurale et fonctionnelle de ces deux molécules dans la régulation des processus apoptotiques [12]. Le rôle et le mode d'action de *ced-4* commencent à se dévoiler avec la description des premiers analogues humains (*m/s n° 11, vol. 13, p. 1342*): ils codent pour les Apaf (*apoptosis protease-activating factors*) qui joueraient un rôle de chaperon et catalyseraient l'activation des caspases [13, 14]. C'est en fait à *ced-3* que revient le rôle essentiel dans la mort programmée des 131 cellules au cours du développement de *C. elegans*. Toutes les mutations réduisant ou abolissant complètement son activité entraînent en effet la survie de ces cellules, tandis que l'expression de *ced-3* dans des cellules de mammifères induit leur apoptose [15]. La détermination de la séquence de *ced-3* a permis d'identifier un analogue de son produit chez les mammifères, la protéine ICE (*interleukine-1 β converting enzyme*), antérieurement connue pour son activité protéasique impliquée dans la maturation de l'interleukine-1 β [16]. De plus, les mutations qui affectent l'activité de CED-3 touchent des régions homologues de ICE dont on sait qu'elles sont indispensables à son activité protéasique; cela suggère qu'une activité protéasique est essentielle à la protéine CED-3 dans l'exécution du signal apoptotique.

A partir d'un organisme invertébré d'un millier de cellules, on a donc pu établir une modélisation des processus apoptotiques, identifiant deux grandes familles de gènes (*figure 1*): des gènes anti-apoptotiques (*BCL-2/ced-9*), qui règlent l'engagement définitif ou non vers la phase irréversible de mort [4, 11] qui est induite par les produits des gènes pro-apoptotiques, des protéases de la famille ICE/CED-3 [17]. Si le schéma général est très conservé entre nématodes et mammifères, il s'est néanmoins enrichi (ou compliqué et sophistiqué) chez les mammifères de multiples gènes, tant pour la famille *Bcl-2* (plus de 15 gènes connus), que pour celle des protéases de la famille ICE/*ced-3*. Tous les signaux apoptotiques convergeant vers ce tronc commun effecteur de la mort cellulaire, une recherche intensive s'est développée pour identifier ces protéases, leur mode d'action, et les outils per-

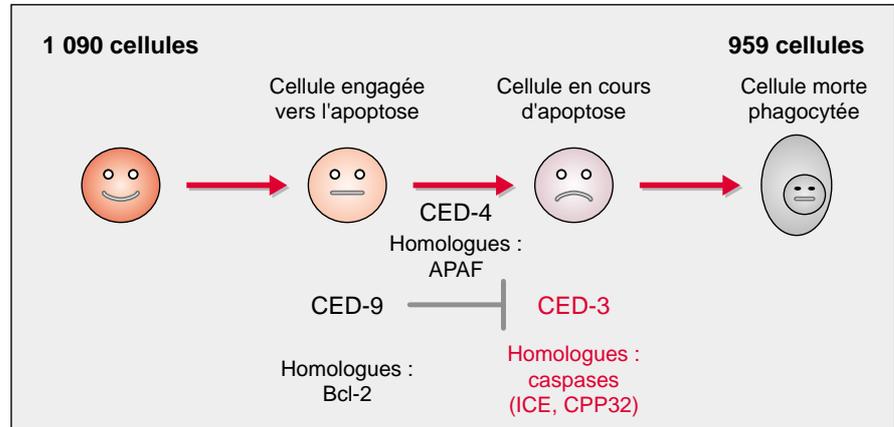


Figure 2. Apoptose au cours du développement chez *C. elegans*. 131 cellules disparaissent par un processus ayant toutes les caractéristiques de l'apoptose. Trois gènes-clés, *ced-3*, *ced-4* et *ced-9* sont impliqués dans la mort ou la survie de ces 131 cellules. Le gène *ced-9* s'est révélé homologue de *BCL-2*, *ced-3* l'homologue des caspases. Le gène *ced-4* a aussi des homologues humains: ils codent pour les Apaf (apoptosis protease-activating factors) qui joueraient un rôle de chaperon et catalyseraient l'activation des caspases.

mettant de les activer ou de les bloquer [18]. Une dizaine d'analogues de ICE/*ced-3* ont ainsi été rapidement clonés. Les protéases qui en ont été déduites possèdent toutes un site actif catalytique très conservé, composé d'un résidu cystéine inclus dans une séquence peptidique de type QACRG*, leur conférant une spécificité de reconnaissance et de clivage au niveau de résidus aspartate en position P₁. Les résidus entourant l'aspartate dans les substrats influencent la spécificité des différentes protéases. Ces spécificités et l'émergence de nouvelles protéases ont fait naître une nomenclature internationale; on les appelle caspases et on les numérote selon l'antériorité du clonage de leur ADNc [17] (*figure 3*). A ce jour, les gènes codant pour douze caspases sont clonés; une analyse phylogénétique permet de définir trois grandes sous-familles: celles de la caspase-1 (ICE), de la caspase-2 (ICH1), et enfin de la caspase-3 (CPP32). Les protéases de type ICE reconnaissent préférentiellement un site présentant un aspartate en P₁ et un résidu hydrophobe comme la tyrosine en P₄ (ce qui correspond au site YVHD* de clivage de la pro-IL1-

β). Les protéases de type CPP32 ont une plus grande affinité pour les sites comprenant un résidu aspartate en P₁ et un résidu anionique comme l'aspartate en P₄ (sites de type DXXX*) [8].

La présence de résidus aspartate sur ces protéases elles-mêmes est une autre donnée structurale très importante. En effet, toutes les caspases existent sous forme de pro-enzymes inactives, et elles subissent un clivage à ces sites qui favorisent la dimérisation de leurs deux sous-unités actives comprenant le site catalytique QACRG. Ce clivage, conduisant à l'activation de la forme pro-enzymatique inactive des caspases, est le fait d'une auto-activation ou d'un clivage par d'autres protéases à cystéine, schématiquement décrit comme un processus en cascade (*m/s n° 4, vol. 12, p. 541 et n° 11, vol. 12, p. 1263*) [18], en particulier dans la transmission du signal émis par Fas ou TNF [19, 20]. Les régions amino-terminales des caspases, appelées les pro-domaines, font d'ailleurs l'objet de recherches intenses, tant elles semblent impliquées dans la régulation de l'activation des caspases [18]. La caractérisation du site catalytique de ces protéases et de leur site de reconnaissance est à l'origine du développement d'inhibiteurs de synthèse facilitant l'étude fonctionnelle des caspases et ouvrant les perspectives thérapeutiques décrites plus loin.

* Code à une lettre des acides aminés: A: Ala; C: Cys; D: Asp; E: Glu; F: Phe; G: Gly; H: His; I: Ile; K: Lys; L: Leu; M: Met; N: Asn; P: Pro; Q: Gln; R: Arg; S: Ser; T: Thr; V: Val; W: Trp; Y: Tyr.

En outre, certaines caspases sont impliquées dans les premières étapes de la transmission du signal des récepteurs contenant des domaines de mort (*death domain*) [19, 20]. Ces récepteurs (TNF-R, Fas, DR3) une fois activés recrutent à la membrane un complexe, appelé DISC (*death-inducing signalling complex*), composé de molécules adaptatrices (FADD, TRADD), et de la caspase-8, proche d'ICE, dite FLICE. La constitution de ce DISC est suivie du clivage protéolytique de FLICE, qui se débarrasse de sa portion amino-terminale et, devenant ainsi active, déclenche l'activation en cascade des autres caspases et la phase ultime des processus apoptotiques [18].

Étude fonctionnelle des caspases

L'étude des caspases, de leur rôle et de leur régulation repose sur plusieurs stratégies: étude de leurs substrats, surexpression, invalidation génique ou fonctionnelle par des agents naturels (membres de la famille *bcl-2*, gènes anti-apoptotiques viraux tels que *CrmA* du cowpox virus ou *P35* du baculovirus) ou synthétiques.

• Les substrats

A ce jour, une vingtaine de substrats des caspases ont été caractérisés, parmi lesquels la pro-IL-1 β , la PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) (*m/s n° 10, vol. 11, p. 1487*), des lamines nucléaires, l'unité de 70 kDa de la ribonucléoprotéine U1 (U1-70kDa sNRP), la topo-isomérase I, une protéine kinase-dépendante de l'ADN, les SREBP (*sterol response element binding protein*) (*m/s n° 4, vol. 11, p. 642*), l'actine, la fodrine, la protéine-kinase C PKC δ , ainsi que les diverses formes inactives des protéases (pro-ICE, pro-CPP32, etc.). Le clivage protéolytique a pour conséquence, soit l'activation de protéines impliquées dans le déroulement du processus apoptotique, c'est le cas pour les pro-caspases ou des endonucléases telles que la *DNA fragmentation factor* (DFF) (*m/s n° 8-9, vol. 13, p. 1073*), [21], soit l'inactivation de protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire. En revanche, le clivage protéique de chacun de ces substrats pris un à un ne semble pas avoir de consé-

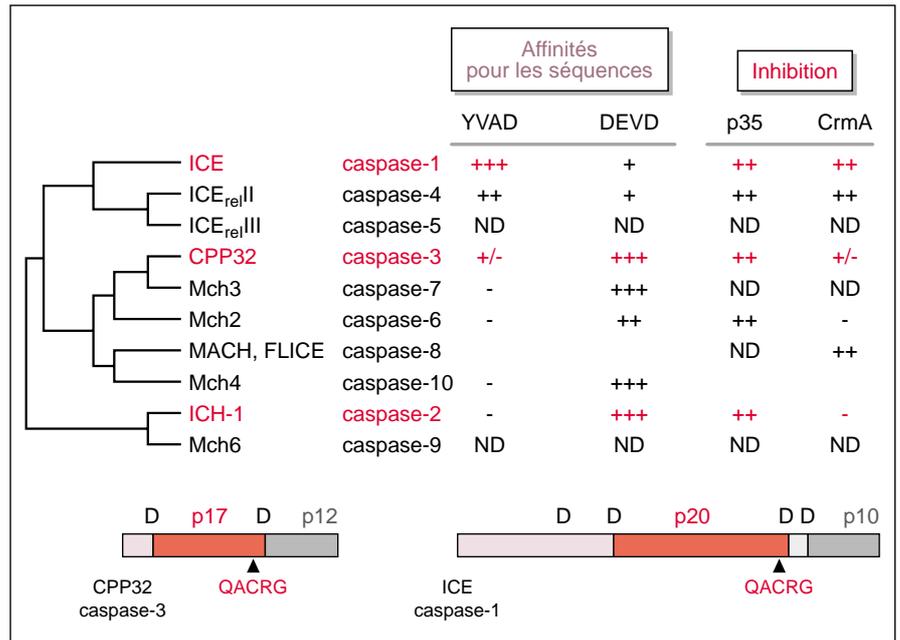


Figure 3. **Nomenclature et structure des caspases, et inhibition par les protéines virales (*CrmA*, *p35*) ou les peptides *YVAD* et *DEVD*.** La présence de résidus aspartate sur ces protéases est une donnée structurale très importante. Toutes les caspases existent sous forme de pro-enzymes inactives, et subissent un clivage à ces sites qui favorisent la dimérisation de leurs deux sous-unités actives comprenant le site catalytique QACRG (voir code à une lettre des acides aminés, p. 11).

quences majeures pour la cellule. Le clivage simultané de nombreuses protéines impliquées dans le maintien du cytosquelette de la cellule, la réparation de l'ADN, la séquestration de la DNase I (endonucléase associée à l'actine et impliquée dans la fragmentation de l'ADN), ou la synthèse des membranes doivent être les étapes nécessaires à l'accomplissement de la phase ultime de l'apoptose par les protéases activées [5].

• Les expériences de surexpression

Le rôle des protéases à cystéine a été initialement estimé par des expériences de surexpression dans divers types cellulaires. Ces essais de surexpression sont néanmoins sujets à discussion, car ils sont réalisés à partir de transfections de séquences codant pour les formes immatures de ces protéases, et on sait bien que la présence de protéases, y compris d'autres types comme les protéases à sérine, à des doses supraphysiologiques dans une cellule peut naturellement y avoir des effets cytotoxiques sans signification particulière quant à leurs fonctions apoptotiques.

L'identification des rôles respectifs des différentes caspases, de leurs mécanismes et de leurs spécificités d'activation font l'objet de nombreuses études actuellement. Plusieurs de ces protéases sont synthétisées dans un grand nombre de tissus et dans les mêmes types cellulaires. Dans une même cellule en revanche, des signaux inducteurs d'apoptose différents, même s'ils finissent *in fine* par aboutir à l'activation de caspases, pourraient avoir des spécificités d'activation d'une protéase particulière. En outre, les caspases sont capables de s'activer mutuellement, principalement en cascade comme cela a été suggéré pour les voies de Fas et du TNF. Enfin, les caspases pourraient avoir des fonctions non apoptotiques, comme par exemple ICE au cours de l'inflammation, permettant le clivage de la pro-IL-1 β et les effets pro-inflammatoires de l'IL-1 β .

• Les expériences d'inactivation

Aussi, deux grandes stratégies sont venues éclairer ou compliquer la situation: l'inactivation des gènes, et leur inhibition par des protéines natu-

relles ou des molécules de synthèse. La première étude d'inactivation *in vivo* d'un gène codant pour la caspase-1 (ICE), a posé la première pierre de la série [22, 23]. Les souris déficientes en ICE se développent normalement, et leurs cellules ne sont pas particulièrement résistantes à l'apoptose, hormis les thymocytes résistants à l'apoptose relayée par Fas. En revanche, les souris *ICE^{-/-}* ne produisent pas d'IL-1 β , comme attendu, et sont résistantes au choc septique. Ces résultats sont intéressants et surprenants, tant le rôle clé d'ICE situé au milieu de protéases activées en cascade avait semblé séduisant [18]. Cela suggère la probable redondance de l'activité protéasique des membres de cette famille, mécanisme sans doute important pour éviter les conséquences désastreuses pour un organisme multicellulaire d'une perturbation générale de l'apoptose. De plus, l'existence de sous-familles protéasiques présentant des spectres d'action voisins permettrait le bon fonctionnement des cascades. Enfin, les résultats sur les souris *ICE^{-/-}* peuvent suggérer une spécificité tissulaire des protéases, puisque seuls les thymocytes semblent présenter un phénotype modifié par l'absence de ICE. Ce résultat paraît crucial au vu du second modèle d'invalidation génique qui intéresse la CPP32 [24]. En effet, les souris *CPP^{-/-}* présentent au stade embryonnaire un défaut d'apoptose neuronale, indispensable au développement harmonieux des animaux. Ces anomalies de mise en place du système nerveux central expliquent une certaine létalité embryonnaire et la mortalité dans les 15 premiers jours de vie. La troisième invalidation génique connue à ce jour, celle de ICH-1 (caspase-2), semble faire jouer à cette caspase un rôle important dans les cellules germinales et lymphoïdes, bien qu'aucune altération majeure du phénotype ne soit observée.

• Les expériences d'inhibition

L'identification ou la synthèse de molécules qui modulent ou inhibent les processus apoptotiques ont permis de mieux préciser le rôle des caspases au cours de la mort programmée. Ces molécules sont les protéines de la famille Bcl-2, certaines protéines virales telles que

CrmA, p35 et les FLIP (*viral FLICE inhibitory proteins*), ou des peptides synthétiques tels que zVAD, YVAD, ou DEVD.

La description des gènes de la famille *bcl-2* a déjà fait l'objet de nombreuses revues dans *médecine/sciences*, et nous n'évoquerons dans cette mise au point que les derniers résultats sur la régulation de l'activité des caspases par les membres de la famille Bcl-2. Le gène *bcl-2* est le membre fondateur d'une famille d'une quinzaine de gènes à activité, soit anti-apoptotique tels que *bcl-xL* ou *bcl-w*, soit pro-apoptotique tels que *bax*, *bak* ou *bik* (*m/s n° 3, vol. 13, p. 384*). Tous les signaux inducteurs d'apoptose, à de rares exceptions et dans de rares types cellulaires, semblent devoir être modulés par les gènes de cette famille [25]. Cette modulation se situe en amont de l'activation du tronc commun des caspases, et ne présente pas de spécificité pour les différents types de caspases [26]. Les interactions entre les membres de la famille Bcl-2 et les caspases étaient restées jusqu'à présent, peu, voire inexpliquées. Ces interactions semblent aujourd'hui mieux comprises grâce à des travaux récents soulignant le rôle-clé de la localisation mitochondriale et de la structure de Bcl-2 et Bcl-xL (de type canal ionique) (*m/s n° 5, vol. 13, p. 738*) [27], ainsi que leurs capacités d'interagir avec les pro-domaines des caspases, directement par interaction protéine/protéine [28, 29], ou indirectement *via* la libération dans le cytosol par la mitochondrie de cytochrome c [30-32], et/ou d'une protéase « apoptogénique », *apoptosis inducing factor* AIF (*figure 4*). Ces derniers travaux font l'objet de trois revues exhaustives [25, 33, 34].

Certains gènes viraux codent pour des protéines anti-apoptotiques, leur permettant d'inhiber l'apoptose induite par le système immunitaire des cellules infectées, et ainsi de persister et de se multiplier chez l'hôte. C'est le cas de l'adénovirus qui possède un homologue du gène *bcl-2* codant pour la protéine anti-apoptotique E1B19K [35]. Le niveau d'inhibition de cette protéine se situe en amont des caspases (*figure 1*). En revanche, le baculovirus et le *cowpox* virus possèdent les gènes codant pour deux protéines virales, p35 et

CrmA, qui inhibent de nombreuses caspases et contrôlent le processus apoptotique à son ultime niveau de régulation (*figure 1*). La protéine p35 possède en effet une séquence peptidique DMQD qui en fait un substrat pour toutes les caspases connues. La protéine p35 clivée libère une sous-unité de 10 kDa qui se fixe de façon irréversible aux protéases, abolissant leur activité protéasique [36]. La protéine p35 est *a priori* un inhibiteur plus spécifique de CPP32: elle inhibe cependant toutes les caspases testées jusqu'à présent. CrmA (*cytokine response modifier*) du *cowpox* virus présente une séquence peptidique LVAD, reconnue et clivée par les protéases à cystéine, qui lui confèrent une spécificité d'inhibition pour les protéases de la sous-famille de ICE [37]. De plus, CrmA est une serpentine, c'est-à-dire un inhibiteur des protéases à sérine, parmi lesquels on trouve la granzyme B, une sérine protéase qui possède cependant une spécificité de reconnaissance des sites Asp, et active la CPP32. Les protéines CrmA et p35 ont toutes deux démontré leur capacité de s'opposer à l'activation des caspases induite dans de nombreux types cellulaires par divers signaux inducteurs. Les exemples les mieux documentés sont: (1) la privation en sérum de fibroblastes; (2) la privation en facteur de croissance NGF de neurones sympathiques; (3) l'apoptose relayée par Fas, TNF ou par l'action de la granzyme B; (4) l'apoptose induite par le retrait des protéines de la matrice extracellulaire nécessaires à la survie des cellules épithéliales [4].

Dernièrement, de nouvelles protéines virales, les FLIP, ont été caractérisées comme des molécules anti-apoptotiques s'opposant aux signaux apoptotiques relayés par les récepteurs possédant des domaines de mort (*death domain*) [38]. Ces molécules permettent elles aussi aux virus qui les expriment, principalement ceux de la famille des virus herpès, de s'opposer à l'apoptose des cellules qui les hébergent, et donc de persister. Ces protéines s'associent au DISC cité plus haut, et s'opposent donc à l'activation en cascade des caspases (FLICE, ICE, CPP32). Ces dernières protéines virales complètent les différents niveaux possibles d'inhibition des caspases ou de leur activation:

dans la transmission du signal en ce qui concerne les FLIP, dans la phase de contrôle pour E1B19K, apparenté à Bcl-2, enfin, comme inhibiteur compétitif des caspases pour p35 ou CrmA.

Enfin, des peptides synthétiques, inhibiteurs des caspases, ont été fabriqués, essentiellement dans un premier temps pour des études *in vitro*. Il s'agit de tri- ou de térapeptides, possédant la séquence de reconnaissance spécifique YVAD ou DEVD des protéases, couplée à des fonctions aldéhyde ou cétone qui leur confèrent la capacité de se fixer au site catalytique QACRG des caspases. Les dérivés aldéhydes ou nitriles sont des inhibiteurs réversibles (YVAD-CHO), tandis que les composés méthylcétones qui forment des ponts disulfures avec la cystéine du site actif des caspases sont des inhibiteurs irréversibles (YVAD-CMK, ZVAD-FMK). Ces inhibiteurs ont permis de confirmer l'implication des caspases dans une grande variété, voire dans quasiment tous les processus apoptotiques [8]. Les peptides synthétiques ont deux avantages supplémentaires par rapport aux molécules anti-apoptotiques virales CrmA ou p35 : leur sélectivité pour des sous-familles de protéases à cystéine devrait permettre d'affiner la participation relative de tels ou tels types de caspases dans des voies différentes d'apoptose et des types cellulaires différents ; enfin, des perspectives d'utilisation thérapeutique de ces inhibiteurs au cours des hépatites fulminantes ou de l'infarctus du myocarde et des accidents vasculaires cérébraux ischémiques, par exemple, semblent se dessiner pour un avenir assez proche.

• Les interactions entre caspases et mitochondrie

La mitochondrie a pris une place considérable dans la description de la mort programmée et de ses mécanismes de régulation au cours des deux dernières années [6]. Elle semble en effet impliquée dans deux phases de l'apoptose (figure 1), la phase de contrôle et la phase effectrice. L'analyse des mitochondries de cellules engagées en apoptose met en évidence une diminution de leur potentiel transmembranaire ($\Delta\Psi_m$), caractérisée par un gonflement de la mitochondrie et expliquée par l'ouver-

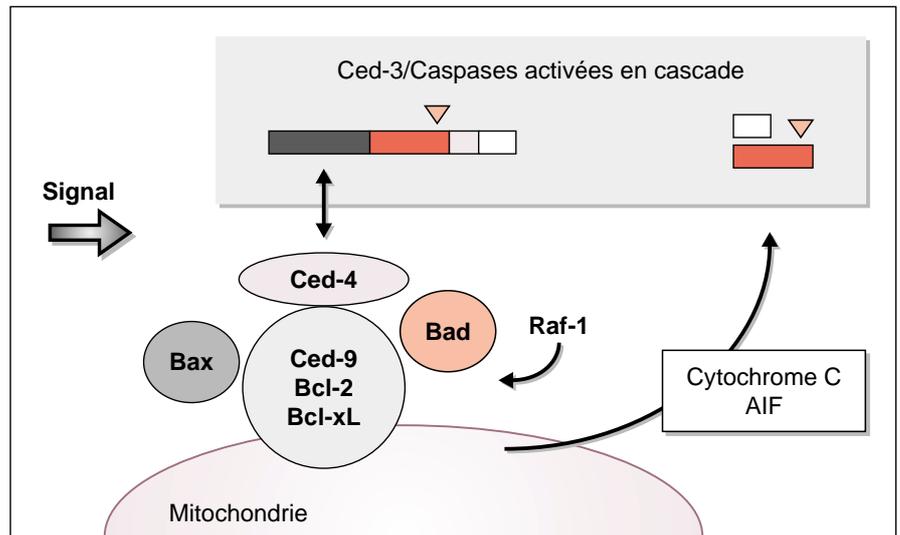


Figure 4. **Interactions entre les protéines de la famille Bcl-2, la mitochondrie, et les caspases.** L'ouverture des pores de la mitochondrie est réglée par Bcl-2 et ses partenaires. L'ouverture de ces pores semble responsable de la libération dans le cytoplasme de facteurs qui vont déclencher l'activation des caspases (cytochrome c; AIF, apoptosis inducing factor). Par ailleurs, Bcl2 et ses partenaires anti-apoptotiques sont capables de séquestrer ou de recruter à la membrane mitochondriale des pro-caspases, empêchant ainsi leur activation.

ture de mégapores, dits *mitochondrial permeability transition pores* (MTP). L'ouverture de ces pores semble finement réglée par Bcl-2 et ses partenaires [7], dont on rappelle l'ancrage dans la membrane externe des mitochondries, et la capacité de se comporter comme des canaux ioniques (*m/s n°5, vol. 13, p. 738*) [25]. L'ouverture de ces pores semble responsable de la libération dans le cytoplasme de facteurs qui vont déclencher l'activation des caspases (cytochrome c) ou leur clivage protéolytique (AIF) (figure 4, d'après [34]). La protéase AIF, inhibée par zVAD, semble capable à elle seule d'induire la protéolyse et la fragmentation nucléaire caractéristique de l'apoptose [7].

En outre, l'ouverture des mégapores mitochondriaux contribue à amplifier la phase effectrice de la mort de la cellule par le relargage dans le cytosol de radicaux libres et de calcium, et par l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale avec déplétion en ATP. Ainsi, en participant à l'activation des caspases comme à la libération dans le cytosol de facteurs « apoptogéniques » indépendants des caspases, la mitochondrie apparaît comme un acteur clé des processus apoptotiques.

Cette dernière notion permet d'expliquer plusieurs points remar-

quables. Le premier est que toute activation de caspases n'est pas synonyme de mort cellulaire, comme cela a été récemment rapporté [39], et donc qu'un ensemble d'acteurs coopèrent à l'exécution du programme de mort. Les caspases ont probablement d'autres rôles que ceux décrits dans l'apoptose ; par exemple, ICE (caspase-1) a d'abord été connue pour son rôle dans la maturation de l'interleukine-1 β au cours des processus inflammatoires. En outre, de rares morts apoptotiques peuvent être observées malgré l'inhibition pharmacologique effective des caspases, comme par exemple celles induites par l'hyperexpression de Bak ou de Bax [40, 41], suggérant l'existence de mécanismes d'apoptose dépendants et partiellement indépendants des caspases.

Modulation de l'activation des caspases ou de leurs activités protéasiques : vers des perspectives thérapeutiques

Le clivage protéolytique par les caspases apparaît néanmoins comme une étape clé du processus apoptotique, un point de non-retour. L'acti-

vation des caspases, qui en est une des dernières étapes réglées, devient donc une cible thérapeutique d'intérêt, soit que l'on cherche à la déclencher dans les cellules tumorales par exemple, soit que l'on cherche à l'inhiber ou à bloquer les protéases activées lors de maladies caractérisées par une suractivation de phénomènes apoptotiques [9]. Les moyens d'activer sélectivement les protéases dans certaines cellules restent pour l'instant très hypothétiques. En revanche, les inhibiteurs synthétiques s'avèrent de bons candidats aux traitements symptomatiques de maladies caractérisées par une apoptose excessive, particulièrement en situation aiguë. En effet, l'inhibition prolongée de l'apoptose, processus physiologique impliqué, entre autres, dans l'élimination de cellules malades ou vieillissantes, semble déraisonnable.

La liste des affections dans lesquelles un dysfonctionnement de l'apoptose, ou la survenue inappropriée de processus apoptotiques, semble impliquée dans la pathogénie va en s'allongeant, cédant parfois à des effets de mode. Sont regroupées dans le *Tableau I* les principales affections pour lesquelles des arguments acceptables sont validés. Les maladies aiguës, dont l'histoire naturelle semble impliquer une suractivation de processus apoptotiques, incluent entre autres les maladies associées à l'ischémie/reperfusion et à la production de radicaux libres ou, enfin, celles associées à une suractivation des mécanismes de cytotoxicité relayée par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL).

Il est en effet clairement démontré que la production intracellulaire de radicaux libres est un puissant inducteur d'apoptose, entre autres dépendante de p53 [42]. Cette notion a été approfondie au cours de travaux, expérimentaux jusqu'à présent dans des modèles d'accidents vasculaires cérébraux ischémiques [43], et depuis peu expérimentaux et cliniques au cours de l'infarctus du myocarde. Deux équipes ont en effet démontré, dans des modèles d'infarctus et de reperfusion chez des rats ou des lapins, que les lésions classiques de nécrose cellulaire au centre des zones les plus anoxiques sont entourées d'importantes zones d'apoptose qui participent de façon indépen-

Tableau I			
MALADIES ASSOCIÉES À UN DÉRÈGLEMENT DE PROCESSUS APOPTOTIQUES			
Systèmes	Exemples	Apoptose	
		Suractivée	Inhibée
Maladies neuro-dégénératives	Alzheimer	+	
	SLA	+	
	Parkinson	+	
Désordres immunitaires	Maladies auto-immunes		+
	SIDA	+	
	Diabète	+	
	Thyroïdite	+	
Ischémie Reperfusion	Infarctus du myocarde	+	
	AVC	+	
Néoplasies	Lymphomes		+
	Astrocytomes		+
	Hépatomes		+
	Mélanomes		+
	autres		+
Divers	Vieillessement	+	
	Alopécie	+	

SLA : sclérose latérale amyotrophique.
AVC : accident vasculaire cérébral.

dante au pronostic de ces atteintes myocardiques [44]. Ces résultats viennent d'être confirmés par un travail récent chez l'homme : de tels phénomènes interviennent dans l'histoire naturelle de la maladie ischémique coronaire, d'autant plus que des efforts importants ont été faits pour réouvrir l'artère coronaire occluse (thrombolyse, angioplastie coronaire) et qu'on a ainsi favorisé les lésions de reperfusion [45]. Il devient donc clair que l'administration *in situ* d'inhibiteurs des caspases pourrait devenir un nouvel élément de la prise en charge de l'insuffisance coronaire aiguë. Concernant l'ischémie cérébrale et ses conséquences, l'équipe de Yuan vient également de démontrer récemment le bien-fondé d'une telle stratégie [43]. Des souris et des rats traités par les inhibiteurs des caspases *in situ* (zVAD et YVAD) sont en effet protégés de manière significative des dégâts cellulaires apoptotiques encéphaliques produits lors de la reperfusion après un clampage de l'artère cérébrale moyenne, et présentent une amélioration fonctionnelle spectaculaire.

Concernant le rôle de l'apoptose au cours des maladies infectieuses, c'est l'identification de son implication comme processus-clé de la réaction d'immunité cellulaire cytotoxique qui la place elle aussi comme un enjeu thérapeutique. On sait en effet désormais qu'un lymphocyte T cytotoxique (CTL) détruit par apoptose une cellule cible, infectée par des virus, transformée par un processus oncogénique, ou exprimant des antigènes du non-soi en transplantation allogénique par exemple. Deux grandes voies ont été caractérisées dans ce processus de cytotoxicité induite par le CTL : le système perforine/granzyme et le système Fas [46]. Le premier système implique la formation de micropores dans la cellule cible reconnue par le CTL, sous l'effet de l'activité perforine, ce qui permet l'entrée dans cette cellule, ainsi que la translocation nucléaire de protéines de la famille des granzymes, principalement la granzyme B, induisant l'activation de caspases, notamment la CPP32 [47]. Le second système implique le couple Fas et son ligand, Fas ligand (FasL) caractérisé au début des années 1990

[19]. Fas, encore désigné par les acronymes APO-1 et CD95, est un récepteur membranaire exprimé à la surface des cellules de nombreux tissus, tels que le thymus, le cœur, le rein, le foie, et les CTL. L'interaction de Fas avec FasL, exprimé par les CTL et les cellules *natural killer* activées, engendre, *via* le domaine de mort intracellulaire de Fas (*death domain*), l'activation en cascade de caspases, puis l'apoptose de la cellule cible. La voie de Fas peut être soit déficiente en cas de mutations spontanées de Fas ou de FasL, soit suractivée, par exemple au cours du SIDA ou des hépatites virales, particulièrement au cours de leurs formes fulminantes (*m/s n° 1, vol. 12, p. 84*). On sait en effet que les virus hépatotropes sont peu cytopathogènes, et que les lésions qu'ils entraînent sont surtout le fait de la réaction immune cellulaire, et donc de l'apoptose des hépatocytes qu'elle déclenche. Les phénomènes apoptotiques induits dans le foie par les systèmes perforine/granzyme, Fas/Fas-L ou TNF α semblent donc modulables par des moyens thérapeutiques ayant pour cible le tronc commun distal constitué par les caspases. Notre équipe et une équipe suisse ont effectivement pu montrer respectivement que les composés YVAD-CMK et zVAD-FMK bloquent les caspases et permettent de prévenir et même de guérir les hépatites fulminantes expérimentales induites par les systèmes Fas et TNF α . En effet, administrés avant, mais aussi après l'injection de l'agent déterminant l'apoptose hépatique mortelle, à un moment où déjà plus de 40 % des hépatocytes sont apoptotiques, ces inhibiteurs empêchent le développement ou l'extension de l'apoptose, et permettent la survie des animaux traités sans effets indésirables graves [48, 49]. Ces résultats ouvrent des perspectives thérapeutiques complètement nouvelles pour la prise en charge des hépatites fulminantes, affection grevée d'une très lourde mortalité, et dont le seul traitement actuel demeure la transplantation hépatique en urgence.

Conclusion

L'expansion extrêmement rapide des travaux dans le domaine de l'apoptose et des caspases attestent de l'importance de ces phénomènes en physiolo-

gie comme en pathologie, et du rôle fascinant que jouent les caspases dans des réponses biologiques aussi diverses que l'inflammation ou l'apoptose. Leur multiplicité, la meilleure connaissance de leurs spécificités tissulaires et d'activation, la constatation qu'elles constituent le dernier niveau de contrôle des processus apoptotiques, un point de non retour, ainsi que le développement d'inhibiteurs synthétiques en font des cibles d'interventions thérapeutiques pour demain ■

RÉFÉRENCES

1. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7: 663-98.
2. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-9.
3. Denis H, Mignotte B. L'apoptose dérive-t-elle de la mort nucléaire programmée mise en œuvre par les protistes? *Med Sci* 1994; 10: 687-95.
4. White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 1996; 10: 1-15.
5. Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 1995; 82: 349-52.
6. Henkart PA, Grinstein S. Apoptosis: mitochondria resurrected? [comment]. *J Exp Med* 1996; 183: 1293-5.
7. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, et al. The central executioner of apoptosis: Multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med* 1997; 186: 25-37.
8. Nicholson DW. ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 297-301.
9. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-62.
10. Labouesse M. *C. elegans*, les promesses d'un petit animal intelligent: «small is beautiful». *Med Sci* 1994; 10: 337-41.
11. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124: 1-6.
12. Vaux DL, Weissman IL, Kim SK. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human *bcl-2*. *Science* 1992; 258: 1955-7.
13. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90: 405-13.
14. Chinnaiyan AM, Chaudhary D, O'Rourke K, Koorin EV, Dixit VM. Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature* 1997; 388: 728-9.
15. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993; 75: 641-52.
16. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; 376: 37-43.
17. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171.
18. Fraser A, Evan G. A license to kill. *Cell* 1996; 85: 781-4.
19. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-65.
20. Gueydan C, Coessens E. Avancées et perspectives de la recherche sur le facteur de nécrose tumorale (TNF). *Med Sci* 1997; 13: 83-8.
21. Liu XS, Zou H, Slaughter C, Wang XD. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997; 89: 175-84.
22. Kuida K, Lippke JA, Ku G, et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 1995; 267: 2000-3.
23. Li P, Allen H, Banerjee S, et al. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* 1995; 80: 401-11.
24. Kuida K, Zheng TS, Na S, et al. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 1996; 384: 368-72.
25. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997; 3: 614-20.
26. Chinnaiyan AM, Orth K, O'Rourke K, Duan H, Poirier GG, Dixit VM. Molecular ordering of the cell death pathway. *J Biol Chem* 1996; 271: 4573-6.
27. Minn AJ, Velez P, Schendel SL, et al. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997; 385: 353-7.
28. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 1997; 275: 1122-6.
29. Wu DY, Wallen HD, Nunez G. Interaction and regulation of subcellular localization of CED-4 by CED-9. *Science* 1997; 275: 1126-9.
30. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86: 147-57.

RÉFÉRENCES

31. Yang J, Liu XS, Bhalla K, *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129-32.
32. Kluck RM, Bossy-Wetzl E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132-6.
33. Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997; 361: 773-6.
34. Golstein P. Controlling cell death [comment]. *Science* 1997; 275: 1081-2.
35. Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Mohda D, White E. The E1B 19K protein functions as an apoptosis inhibitor by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death promoting Bax protein. *Genes Dev* 1996; 10: 461-77.
36. Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, *et al.* Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 1995; 269: 1885-8.
37. Ray CA, Black RA, Kronheim SR, *et al.* Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 β converting enzyme. *Cell* 1992; 69: 597-604.
38. Thome M, Schneider P, Hofmann K, *et al.* Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 1997; 386: 517-21.
39. Miossec C, Dutilleul V, Fassy F, Diu-Hercend A. Evidence of CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation. *J Biol Chem* 1997; 272: 13459-62.
40. McCarthy NJ, Whyte MK, Gilbert CS, Evan GI. Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* 1997; 136: 215-27.
41. Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14559-63.
42. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994; 15: 7-10.
43. Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, *et al.* Inhibition of interleukin 1 beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2007-12.
44. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, *et al.* Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996; 74: 86-107.
45. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 95: 320-3.
46. Golstein P. Deux mécanismes moléculaires pour la cytotoxicité T: perforine/granzymes et Fas. *Med Sci* 1995; 11: 99-104.
47. Shi L, Mai S, Israels S, Browne K, Trapani JA, Greenberg AH. Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *J Exp Med* 1997; 185: 855-66.
48. Rouquet N, Pages JC, Molina T, Briand P, Joulin V. ICE inhibitor YVAD-cmk is potent against liver apoptosis *in vivo*. *Curr Biol* 1996; 6: 1192-5.
49. Rodriguez I, Matsuura K, Ody C, Nagata S, Vassalli P. Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases *in vivo* and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. *J Exp Med* 1996; 184: 2067-72.

TIRÉS À PART

A. Mignon.

Summary

Proapoptotic ICE/ced3 cysteine proteases: future prospects for pharmacological inhibition

Experimental and clinical data provide strong evidences of the involvement of inappropriate apoptosis in several human diseases. Considerable progress has been made recently in the identification of the key biochemical players that contribute to the highly ordered and evolutionarily conserved process of programmed cell death. Apoptosis, which is induced or controlled by many different signaling pathways, ultimately converges to a single « final common pathway », namely the activation of the cell death machinery, involving members of the emerging family of cysteine proteases related to mammalian interleukin-1 converting enzyme (ICE). Once activated, these proteases will initiate the irreversible stages of the apoptotic process. ICE-like cysteine proteases cleave their target substrates after a unique recognition site containing an aspartic acid, and have been therefore designed caspases. Biochemical characterization of these cysteine proteases, of their function and activation pathways, and the recent characterisation of natural or synthetic inhibitors open an avenue for a future scientific and therapeutic challenge: the control of human diseases where inappropriate or uncontrolled apoptosis is a prominent physiopathological feature.

DIPLÔME D'UNIVERSITÉ DE CHRONOBIOLOGIE

Année Universitaire 1998

- Un enseignement de Chronobiologie est organisé à la Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, sous la direction du Professeur Yvan Touitou. Il a pour but de donner une formation théorique et pratique aux étudiants pour leur permettre l'utilisation des méthodes chronobiologiques. Le diplôme est ouvert aux médecins, pharmaciens, chirurgiens-dentistes, internes des hôpitaux, maîtres ès sciences et, sur proposition du directeur d'enseignement, aux candidats intéressés par la Chronobiologie ayant tous autres titres et travaux. L'enseignement se déroule sous la forme de 5 séminaires de 2 jours chacun, en janvier, février et mars. Il est dispensé à la Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière à Paris. Les étudiants salariés peuvent s'inscrire dans le cadre de la formation permanente (prise en charge de l'inscription par l'employeur).
- L'enseignement porte sur les aspects fondamentaux et appliqués des rythmes biologiques, de la cellule à l'homme. Il est sanctionné par un examen écrit et oral permettant l'obtention du Diplôme d'Université.

Le programme des cours est le suivant :

Lundi 12 et mardi 13 janvier 1998 : Rythmes en pharmacologie et toxicologie.

Lundi 9 et mardi 10 février 1998 : Pathologie et chrono-thérapeutique en endocrinologie, en cancérologie, en psychiatrie, etc.

Lundi 9 et mardi 10 mars 1998 : Développement, vieillissement et adaptation. Photopériodisme et régulation des rythmes biologiques.

Les candidats intéressés doivent faire une demande écrite précisant leur formation universitaire au Professeur Yvan Touitou, DU de Chronobiologie, Faculté de médecine, Pitié-Salpêtrière, 91, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.