

■■■ **Granzyme B et protéine 100K de l'adénovirus: je te tiens, tu me tiens, par la barbichette...** L'imagination dont font preuve les virus, dont les adénovirus, pour s'opposer à l'apoptose des cellules qu'ils infectent n'a pas de limites. L'originalité du nouveau mécanisme décrit dans *Immunity* [1] tient au fait que l'inhibiteur produit par l'adénovirus Ad5, la protéine 100K, bloque l'action de la sérine protéase granzyme B (GrB) directement, mais est à son tour clivé, et donc détruit, par la protéase. Pourquoi est-ce le virus qui gagne, inhibant de façon durable GrB, et non pas la cellule? GrA et B sont des sérine-protéases contenues dans les granules des lymphocytes cytotoxiques dont le contenu est libéré lors d'une infection virale notamment, et qui pénètrent dans la cellule infectée (*m/s* 2001, n° 3, p. 382). Toutes deux entraînent l'apoptose mais par des mécanismes différents: GrB clive et active les caspases 3 et 9 et leurs substrats en aval, mais également d'autres effecteurs cellulaires, alors que GrA agit directement sur l'ADN indépendamment de la voie mitochondriale. Dans le système expérimental utilisé, les cellules infectées par Ad5, et exposées au contenu de granules cytotoxiques ne meurent pas. C'est une protéine virale produite tardivement (16 heures), dite 100K, qui est responsable de cette résistance à l'apoptose. La protéine 100K se fixe directement à GrB, et inhibe le site enzymatique instantanément. Toutefois, le complexe est ensuite lentement clivé par GrB réduisant la protéine 100K en fragments inactifs, ce qui permet la restauration de l'activité protéolytique de GrB. Si la cellule est vaincue dans ce corps à corps, c'est parce que la protéine 100K est produite en très grand excès par rapport au GrB. En effet, GrB entre dans la cellule infectée avec les autres composants des granules cytotoxiques, après son contact avec le lymphocyte cytotoxique et, de ce fait, n'est présent qu'en quantité limitée, puisque la cellule répliquant le virus

n'en produit pas. La restauration d'une activité GrB efficace prendrait plus de 5 jours, autant dire que le virus a le temps de se répliquer efficacement. Le site de 100K essentiel à sa fonction inhibitrice de GrB est l'acide aspartique en position 48, alors que le clivage de 100K par GrB, lui, intervient à d'autres sites. La protéine 100K n'affecte en rien la voie des caspases et n'a aucune homologie avec la famille des serpinines, qui, elles aussi, se complexent avec des enzymes cibles de type sérine-protéases. Dans ce duel virus-cellule, il est intéressant de remarquer que, hormis l'inhibition de GrB, la protéine 100K a d'autres fonctions essentielles: elle est requise pour l'assemblage des virions et la traduction des protéines virales tardives. On peut aussi, comme toujours, voir le bon côté des choses, c'est-à-dire l'utilisation de 100K, ou de peptides mimétiques, pour bloquer les conséquences néfastes de la cytotoxicité provoquée par les granules cytotoxiques, dont GrB, dans certaines réactions virales ou autoimmunes.

[1. Andrade, *et al. Immunity* 2001; 14: 751-61.]

■■■ **La synténine, messenger de l'IL-5 !** Sans intermédiaires cytoplasmiques convoyant leur message au noyau, les cytokines seraient inefficaces. Les facteurs STAT et SMAD sont les prototypes de ces adaptateurs cytoplasmiques interagissant avec les domaines cytoplasmiques des récepteurs transmembranaires. Une équipe hollandaise associée au groupe Glaxo-Wellcome démontre aujourd'hui que la synténine est un messenger privilégié du récepteur de l'interleukine (IL)-5 [1]. L'IL-5 est surtout connue pour son rôle dans la différenciation éosinophile, mais elle contrôle aussi certaines étapes de la maturation des lymphocytes B. Le récepteur comporte une chaîne α liant spécifiquement l'IL-5

et une chaîne β commune aux récepteurs de l'IL-3 et du GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). A la recherche de partenaires actifs du domaine intracytoplasmique de la chaîne α , les auteurs l'ont utilisée comme appât dans un crible par double-hybride dans la levure et ont ainsi isolé la synténine, une protéine contenant des domaines PDZ (*PSD-95/Discs large/zO-1*) en tandem. La liaison synténine-chaîne α de l'IL-5R α , spécifique de ce récepteur et ne se produisant pas avec ceux de l'IL-3 ou du GM-CSF, requiert une phénylalanine en position carboxy-terminale du récepteur et les deux domaines PDZ de la synténine. Afin de compléter la dissection de la cascade d'événements déclenchés par l'activation de l'IL-5R α , les auteurs ont réalisé un double-hybride avec la synténine comme appât, et identifié Sox-4, un activateur transcriptionnel de la famille des protéines dites « à boîte-HMG (*high mobility group*) » en raison de l'homologie de leur domaine de liaison à l'ADN. Cette observation a permis du même coup de comprendre, 4 ans plus tard, pourquoi le phénotype des souris Sox4^{-/-} associait aux anomalies cardiaques un blocage de la différenciation lymphoïde B [2]. Si la synténine est absolument nécessaire à l'activation de Sox-4, elle ne l'est pas pour les autres fonctions de l'IL-5 que sont l'activation de la cycline D1, ou la phosphorylation de ERK-1. La chaîne α de certains récepteurs de cytokines, ici l'IL-5, n'est donc pas uniquement dévolue à la reconnaissance et à la liaison d'une cytokine spécifique du milieu extracellulaire, mais elle permet aussi la transmission d'un signal dont la finalité est l'activation transcriptionnelle de gènes très spécifiques impliqués dans la réalisation d'un processus de différenciation.

[1. Schilham MW, *et al. Nature* 2001; 380: 711-5.]

[2. Geijsen N, *et al. Science* 2001; 293: 1136-9.]

■■■ **Le couple ET-1/ET_B adapte le rein à l'acidose chronique.** L'excrétion accrue d'acide par le rein est une réponse homéostatique à une augmentation de l'apport de protons. Une étape très précoce de l'excrétion urinaire d'acide est la sécrétion d'ions H⁺ dans la lumière tubulaire, sécrétion assurée dans le tubule proximal par une isoforme de l'échangeur Na⁺/H⁺, appelée NHE3. La nature du signal qui déclenche l'augmentation d'activité de cet échangeur en réponse à l'acidose chronique est encore mal comprise. Une étude élégante de Laghmani *et al.* [1] apporte des éléments nouveaux qui impliquent l'endothéline-1 (ET-1), peptide vasoactif qui agit par l'intermédiaire de deux types de récepteurs, ET_A et ET_B, respectivement responsables des effets vasoconstricteurs et vasodilatateurs de cette molécule. Si l'effet stimulant de l'ET-1 sur l'activité de l'échangeur Na⁺/H⁺ a été observé *in vitro*, son implication dans l'excrétion d'acide n'est pas établie. Les auteurs ont utilisé des souris dont le gène du récepteur ET_B a été invalidé par recombinaison homologe. La létalité élevée des animaux homozygotes peu après la naissance, due à un mégacôlon en rapport avec l'absence d'innervation cholinergique, a été évitée par un croisement avec des souris qui expriment le gène ET_B sous le contrôle du promoteur de la dopamine β-hydroxylase, ce qui permet l'expression sélective de l'ET_B dans le côlon. Les animaux répondent alors à une charge acide en développant une acidose métabolique plus accentuée que celle observée chez les souris sauvages. Dans le même temps, l'ET-1 ne stimule pas NHE3 chez les souris mutées alors que cette stimulation est observée chez les souris sauvages. La chaîne d'événements pourrait donc se résumer ainsi : l'acidose augmente l'expression de *c-fos* et de *c-jun* qui composent le complexe AP-1 [2], dont la fixation sur le promoteur de ET-1 aboutit à l'augmentation de la synthèse de ce peptide qui, *via* sa fixation sur le

récepteur ET_B, stimule l'activité de NHE3. Cette régulation paracrine de l'excrétion d'acide pourrait être un argument supplémentaire en faveur du développement d'antagonistes sélectifs de l'ET visant à épargner les « bons » récepteurs ET_B et à ne bloquer que les seuls récepteurs ET_A, fauteurs d'hypertension artérielle et de spasme vasculaire.

- [1. Laghmani K, *et al.* *J Clin Invest* 2001; 107: 1563-9.]
 [2. Yamaji Y, *et al.* *J Clin Invest* 1994; 94: 1297-303.]

■■■ **La sécurine : inhibiteur ou activateur ?** Nous avons récemment décrit dans nos colonnes les mécanismes complexes qui, au cours de la mitose, permettent le maintien de l'association des chromatides sœurs jusqu'au déclenchement de l'anaphase, quand les chromosomes homologues sont attachés au fuseau mitotique et correctement alignés sur la plaque métaphasique (*m/s* 2001, n° 3, p. 353). Les dysfonctionnements de ce processus sont une cause importante d'instabilité génétique conduisant à des pertes ou gains de chromosomes, souvent corrélés au développement de cancers. P.V. Jallepalli *et al.* décrivent maintenant, avec quelques surprises, comment la sécurine joue un rôle majeur dans le maintien de l'euploïdie [1]. La sécurine forme un complexe avec la séparase, une protéase qui permet la protéolyse des complexes cohésines assurant la cohésion des chromatides sœurs. Ce n'est que quand la sécurine est dégradée et se dissocie de la séparase que cette dernière devient active et permet la dissociation des chromatides. Les auteurs montrent que l'inactivation du gène *hsécurine* dans une lignée cellulaire de cancer colorectal (HCT116) dont le caryotype est normalement stable, conduit après 20 générations à une proportion très élevée de cellules aneuploïdes, traduisant ainsi une instabilité chromosomique. De façon surprenante, l'absence de sécurine

ne provoque pas de dissociation précoce des chromatides sœurs. Au contraire, les cellules entrent en mitose normalement, mais le déroulement de l'anaphase est retardé et très perturbé. La séparation des chromosomes est incomplète, ce qui se traduit sur le plan morphologique par un aspect en « haltère », sans séparation franche des masses correspondant aux chromosomes, et par une anomalie de ségrégation des centromères. Les cellules sortent toutefois de mitose, avec des noyaux bourgeonnants et une aneuploïdie. Les auteurs montrent que l'absence de sécurine conduit en fait à des anomalies de la séparase. La quantité totale d'enzyme est en effet diminuée, son clivage – dont on pense qu'il conduit à la libération d'une forme active – est inhibé, et son activité protéolytique est diminuée. Cela est parfaitement en accord avec les données obtenues chez la levure, chez laquelle la délétion du gène de la sécurine a le même effet que la perte de la séparase [2]. Tout se passe comme si la liaison de la sécurine avec la séparase, connue pour inhiber l'activité de cette protéase jusqu'au déclenchement de l'anaphase, était aussi essentielle à l'acquisition de son activité enzymatique.

- [1. Jallepalli PV, *et al.* *Cell* 2001; 105 : 445-57.]
 [2. Funabiki I, *et al.* *EMBO J* 1996; 15 : 6617-28.]

Diplôme inter-universitaire de cytométrie en recherche et en clinique

La prochaine session du DIU, organisée par l'École Pratique des Hautes Études et les Universités Joseph Fourier et Reims-Champagne-Ardenne, aura lieu en 2001-2002. Comme les autres années, quatre modules sont prévus :

22-26 octobre 2001 à Grenoble,
 26-30 novembre 2001 à Grenoble,
 21-25 janvier à Reims
 et 18-22 mars à Grenoble.

Pour toute information, contacter :
 Xavier Ronot,
 Tél. : + 33 (0)4 76 54 94 63
 Fax : + 33 (0)4 76 54 94 14
 E-mail : xavier.ronot@ujf-grenoble.fr