

AIF est impliqué dans un processus d'apoptose embryonnaire

Malgré la profusion d'articles disséquant les voies moléculaires impliquées dans le contrôle de la mort cellulaire, que ce soit par apoptose, nécrose ou paraptose, les mécanismes responsables de la mort de certaines populations cellulaires très sélectives survenant aux tout premiers stades du développement restaient mystérieux [1]. Ainsi, la formation des espaces interdigitaux et le creusement de la cavité amniotique [2], deux processus exemplaires qui requièrent forcément la disparition de certaines cellules, n'étaient que retardés, mais pas abolis, par l'inactivation des molécules contrôlant la voie mitochondriale des caspases, Apaf1, cytochrome c, caspase 9, excluant un rôle prédominant de ces molécules [3, 4]. D'autres gènes avaient été impliqués récemment, *taube nuss* par exemple (*m/s* 2001, n° 3, p. 358), mais leur absence ne mime pas la précision de l'altération sélective accompagnant la morphogenèse embryonnaire. L'article cosigné dans *Nature* par les équipes de G. Kroemer, et celles de l'Ontario Cancer Institute et de Amgen-Toronto, nous fait faire un grand pas en suggérant que AIF, *apoptosis inducing factor*, est un chaînon indispensable à la formation de la cavité amniotique au stade de blastocyste précédant la gastrulation [5]. AIF, dont le gène fut cloné en 1999 par le groupe de G. Kroemer [6, 7] (*m/s* 1999, n° 3, p. 436) est normalement localisé dans la membrane mitochondriale, tout comme le cytochrome c, et, comme lui, est relargué en réponse à un stimulus apoptotique [8]. L'induction par AIF, lorsqu'il est injecté directement dans la cellule, d'altérations caractéristiques du processus apoptotique, condensation chromatiniennne et exposition de phosphatidylsérine à la surface cellulaire, suggérait son implication dans le contrôle de l'apoptose, mais sans que cela ait été démontré *in vivo* [9]. Il semble aujourd'hui que AIF soit essentiel à un programme de mort cellulaire au

cours du développement. Il faut souligner la difficulté expérimentale auquel se heurte toute analyse du rôle du produit d'un gène important pour le développement embryonnaire précoce, ce qui rappelle beaucoup d'écueils des stratégies de *knock-out*. L'approche d'une invalidation conditionnelle n'ayant ici que peu de sens, on peut alors soit analyser les premiers stades de développement *in vitro*, à partir des cellules ES dans lesquelles le gène AIF est muté, soit analyser la contribution de ces cellules ES injectées dans des blastocystes sauvages à la reconstitution d'animaux chimères. AIF étant porté par le chromosome Y, la mutation d'un seul allèle entraîne une homozygotie dans les cellules ES mâles (AIF^{-y}). L'analyse de chimères AIF^{+y}/AIF^{-y} montrait l'absence totale de participation des cellules AIF^{-y} à la constitution des souris, ce qui contrastait avec la constatation que les cellules ES AIF^{-y}, injectées en des souris, se développaient sous forme de tératocarcinomes, dans lesquels elles se différenciaient tout à fait normalement et participaient aux ébauches tissulaires issues des trois feuilletts embryonnaires. Or la première approche (chimère) requiert un processus physiologique d'organogenèse embryonnaire, alors que la seconde ne teste que les multiples capacités de différenciation des cellules au sein d'une structure désorganisée non viable. Cette différence suggérait donc que l'absence d'AIF interférait avec les premiers stades de l'embryogenèse et la gastrulation. Ces toutes premières étapes, difficilement accessibles *in vivo*, peuvent être en partie mimées *in vitro* lors de l'induction de la différenciation des cellules ES, qui survient spontanément si on les cultive en l'absence de LIF (*leukemia inhibiting factor*) ou des fibroblastes qui produisent cette cytokine nécessaire à la prolifération de ces cellules ES sous forme pluripotente. L'engagement immédiat des cellules ES dans un processus de différenciation se traduit par la for-

mation 3 jours plus tard d'un agrégat de cellules ou corps embryoïde, comprenant un centre de cellules de nature ectodermique qu'entoure une couche de cellules endodermiques. Dans environ 40 % des corps embryoïdes, cet agrégat cellulaire se creuse à partir du jour 6 de la culture, formant une cavité réminiscente de la cavité amniotique, dont la taille s'accroît au fur et à mesure de la culture jusqu'à J21 (voir figure 1). Cette cavité résulte d'une apoptose cellulaire massive, mais ciblée au niveau des cellules centrales ectodermiques, comme le montre la condensation chromatiniennne détectée après coloration nucléaire *in situ* par le DAPI (4'-6-dimamidino-2-phénylindole dihydrochloride) et la présence de la forme clivée de la caspase-3 en immunohistochimie. La membrane endodermique périphérique demeure intacte. Or, si les cellules dépourvues d'AIF (AIF^{-y}) se différencient dans une proportion et avec une cinétique identiques à celles des cellules ES AIF^{+y}, il est frappant de constater que le processus d'apoptose des agrégats ectodermiques ne se produit pas et qu'aucune cavité ne se forme dans les corps embryoïdes AIF^{-y}. Qui plus est, en microscopie électronique, les cellules sont intactes, et il n'y a aucun signe de perméabilisation mitochondriale. Si l'absence d'AIF bloque l'apoptose des cellules ectodermiques, les mécanismes ne sont pas encore très bien compris: en amont, on pense que le signal déclenchant émane des cellules externes, endodermiques. Ce signal semble présent dans les corps embryoïdes AIF^{-y}, comme en témoigne l'absence d'altérations phénotypiques de la couche externe de cellules endodermiques, et la restriction du processus apoptotique, dans des corps embryoïdes chimères par agrégation de cellules ES AIF^{+y} et AIF^{-y}, aux seules cellules dérivées de cellules ES AIF^{+y} normales. En aval d'AIF se pose le problème de la voie d'exécution. Même si la caspase

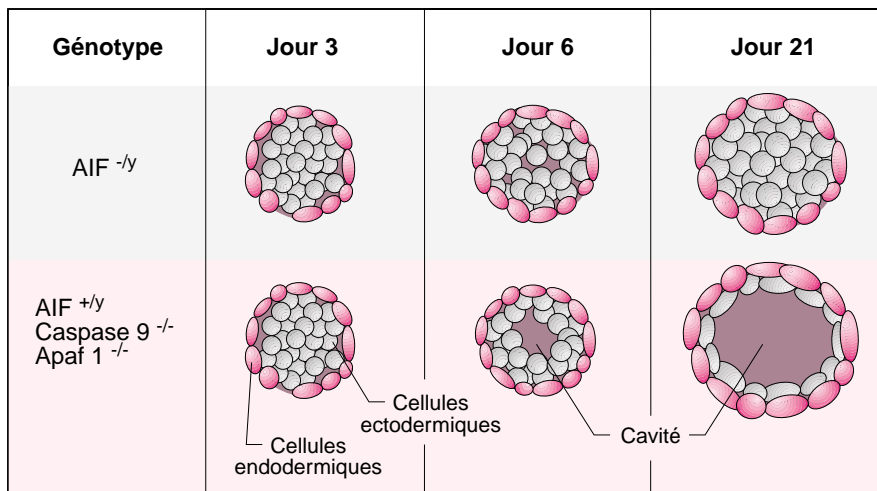


Figure 1. **Évolution des corps embryoides en l'absence d'AIF.** Les corps embryoides se forment spontanément en culture à partir de cellules ES une fois retirés le LIF (leukemia inhibiting factor) ou les fibroblastes qui le produisent. Au jour 6 de culture, dans les corps embryoides sauvages, ou provenant de cellules ES dépourvues de caspase 9 ou d'Apaf-1, une cavité se forme par apoptose des agrégats de cellules internes (ectodermiques) et sa taille s'accroît avec le temps en culture. Dans les corps embryoides dérivés de cellules ES AIF^{-/-}, cette cavité ne se forme pas et les cellules ne montrent aucun signe d'apoptose.

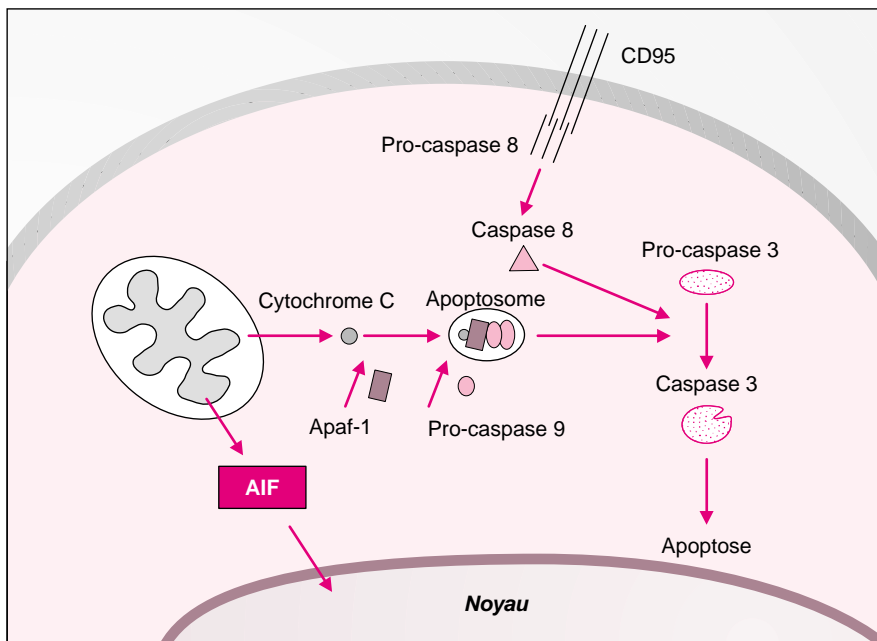


Figure 2. **Schéma illustrant la place d'AIF dans les voies de l'apoptose.** Sur ce schéma apparaissent les voies des récepteurs CD95, les voies mitochondriales : celle classique de la caspase 9, relayée par l'apoptosome (associant cytochrome c, Apaf-1 et caspase-9) et celle de AIF, qui, contrairement au cytochrome c, est relargué vers le noyau et non pas vers le cytosol.

3 est activée, AIF peut agir indépendamment de la voie classique mitochondriale. Le groupe de G. Kroemer avait montré que, après perméabilisation mitochondriale par un stimulus apoptotique, le routage

de AIF diffère de celui du cytochrome, puisque AIF migre de la mitochondrie vers le noyau, alors que le cytochrome c devient cytosolique [10]. Dans les corps embryoides normaux, la voie classique des caspases

n'est pas absolument requise : une cavité se forme dans les corps embryoides issus de cellules ES dépourvues de caspase 9, ou de la molécule Apaf1, ou du cytochrome c, ces deux dernières agissant en amont de la caspase-9, y compris *in vivo*; chez les nématodes, l'absence des molécules orthologues des caspases (CED) n'affecte pas la durée de vie. Il existerait donc deux voies mitochondriales conduisant à l'apoptose embryonnaire : l'une passe par l'activation de la caspase 9 [10] et l'autre par AIF, mais l'intrication de ces deux voies reste à préciser. Rappelons que la caspase-3 est activée dans les corps embryoides normaux, et que les cellules AIF^{-/-} restent sensibles à plusieurs stimulus apoptotiques (etoposide, ultraviolet, staurosporine...) de la voie mitochondriale classique. Enfin, il est intéressant de rappeler que, chez les organismes unicellulaires ou les plantes, un ou des processus de mort cellulaire sont aussi nécessaires que chez les animaux. En l'absence des caspases, qui n'ont pas d'équivalent dans ces organismes, c'est peut-être la voie associée à AIF qui, au moins dans certains cas, contrôle la mort cellulaire.

- Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; 96: 245-54.
- Coucouvanis E, Martin GR. Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* 1995; 83: 279-87.
- Kuida K, et al. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 1998; 94: 325-37.
- Li K, et al. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* 2000; 101: 389-99.
- Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P. Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 1998; 94: 727-37.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001; 410: 549-54.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-6.
- Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 516-24.
- Loeffler M, Daugas E, Susin SA, et al. Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J* 2001; 15: 758-67.
- Daugas E, Susin SA, Zamzami N, et al. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 2000; 14: 729-39.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-6.

Laure Coulombel

Inserm U. 474, Maternité Port-Royal, 123, boulevard de Port-Royal, 75014 Paris, France.