

## Petites molécules antagonistes de Bcl-2 : des grains de sable pour enrayer la carcinogenèse ?

La mitochondrie joue un rôle clé dans l'apoptose en libérant dans le cytosol des protéines qui vont en déclencher ou amplifier les mécanismes effecteurs de cette mort cellulaire. Cette perméabilisation mitochondriale est sous le contrôle de protéines appartenant à la même famille, celle de Bcl2, et qui ont en commun 1 à 4 domaines d'homologie avec Bcl-2 (domaines BH1 à 4). Certaines (Bcl-2, Bcl-xL...) inhibent la perméabilisation mitochondriale et s'opposent à diverses stimulations apoptotiques. D'autres (Bax, Bak...) sont pro-apoptotiques, sont intrinsèquement cytotoxiques et provoquent une perméabilisation mitochondriale. Il est désormais admis que des altérations dans l'exécution de l'apoptose peuvent avoir une influence majeure sur le déclenchement et/ou la progression d'un processus tumoral (voir revue dans [1]). Ainsi, la surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 a été rapportée dans un grand nombre de cancers et associée à une résistance à la chimiothérapie (voir revue dans [2]). Quant à Bax, qui est un des effecteurs de l'apoptose induite par le suppresseur de tumeur p53, la perte de son expression a été associée à une progression tumorale accrue et à une résistance à la chimiothérapie [3, 4]. On comprend donc l'intérêt thérapeutique d'une stratégie qui ciblerait la mitochondrie afin d'inhiber la fonction de survie de Bcl-2, ou de mimer l'activité létale de Bax.

On ne connaît pas avec précision les mécanismes moléculaires qui interviennent dans la cytotoxicité de Bax/Bak et dans la capacité de Bcl-2/Bcl-xL à promouvoir la survie cellulaire (*m/s* 2000, n°2, p. 261) (figure 1). On sait toutefois que l'équilibre entre les membres pro- et anti-apoptotiques de cette famille joue un rôle critique dans la destinée de la cellule car ils s'antagonisent mutuellement par

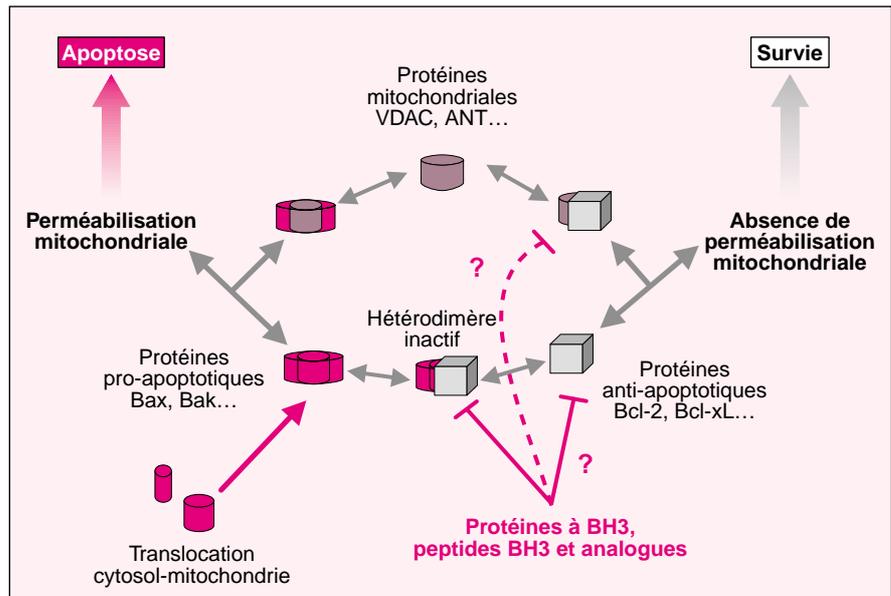


Figure 1. Réseau d'activité des protéines de la famille de Bcl-2. La plupart des protéines de la famille de Bcl-2 sont localisées au niveau de la mitochondrie. Cette localisation est sujette à modulation, au moins dans le cas de la protéine pro-apoptotique Bax qui peut subir une translocation du cytosol vers la mitochondrie en réponse à certaines stimulations apoptotiques. Au niveau de la mitochondrie, membres pro- et anti-apoptotiques s'antagonisent mutuellement en formant des hétérodimères inactifs. Quand elles ne sont pas au sein d'hétérodimères inactifs, ces protéines ont la capacité de former des pores et d'interagir physiquement et/ou fonctionnellement avec des composants structurels de la mitochondrie comme le VDAC (voltage dependent anionic channel) ou l'ANT (adénine nucléotide translocator). Ces propriétés sont susceptibles d'intervenir dans la modulation de la perméabilité mitochondriale par ces protéines. Les protéines à BH3, à l'exception de Bid qui semble présenter une structure particulière, sont dépourvues d'une fonction cytotoxique intrinsèque. Elles répondent spécifiquement à diverses stimulations apoptotiques qui induisent l'exposition de leur domaine BH3. Les protéines à BH3 activées, des peptides représentant des domaines BH3 ou leurs analogues fonctionnels, inhibent l'hétérodimérisation entre membres pro- et anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Leur capacité à inhiber la formation de pores par les protéines anti-apoptotiques ou l'interaction de celles-ci avec les composants mitochondriaux reste mal déterminée [7, 8]. L'action de ces molécules est suffisante pour induire un déséquilibre fonctionnel entre homologues pro- et anti-apoptotiques de Bcl-2 et pour favoriser les mécanismes conduisant à la perméabilisation mitochondriale et l'apoptose plutôt que les mécanismes de survie.

interaction physique directe au sein d'hétérodimères inactifs (figure 1). D'un point de vue structurel, la formation de ces hétérodimères est rela-

tivement bien comprise [5]. L'analyse de la structure tri-dimensionnelle de Bcl-xL révèle une poche hydrophobe formée par ses domaines BH1, BH2

et BH3 qui sont tous trois nécessaires à la fonction anti-apoptotique des homologues de Bcl-2 autres que Bax. Un peptide de 16 résidus comprenant le domaine BH3 de Bak se lie à cette poche hydrophobe sous la forme d'une hélice  $\alpha$ , et il s'avère que ce domaine BH3 des membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 est suffisant pour inhiber l'activité de leurs contreparties anti-apoptotiques. C'est ainsi que fonctionne toute une sous-classe de protéines pro-apoptotiques, qui ne présentent d'homologie avec Bcl-2 qu'au niveau de ce domaine BH3 [2, 5] (*figure 1*). Protéines et peptides à BH3 induisent perméabilisation mitochondriale et apoptose, indiquant qu'il suffit d'inhiber l'hétérodimérisation entre membres pro- et anti-apoptotiques pour promouvoir l'apoptose au sein de cellules de mammifères.

Ces analyses structurales offrent la perspective excitante de pouvoir développer des petites molécules qui soient perméantes à la membrane plasmique et se lient à la poche hydrophobe de Bcl-2/Bcl-xL. Ces molécules pourraient ainsi être introduites au sein d'une cellule tumorale, y mimer l'action des domaines BH3 et y promouvoir l'apoptose (*figure 1*). Trois groupes américains ont récemment décrit de telles molécules. Wang *et al.* [6] ont caractérisé le composé organique HA14-1 par une stratégie de criblage *in silico* fondée sur la structure modélisée de la poche hydrophobe de Bcl-2. Des mesures de polarisation de fluorescence indiquent que HA14-1 déplace de manière compétitive un peptide Bak-BH3 fluorescent de sa liaison à Bcl-2. Une approche similaire a conduit Degterev *et al.* [7] à mettre en évidence deux classes de composés inhibant la liaison de Bcl-xL aux BH3 (BHIs). La liaison directe de ces inhibiteurs à la poche hydrophobe de Bcl-xL a été confirmée par RMN. De manière plus inattendue Tzung *et al.* [8] ont ajouté à cette liste d'inhibiteurs l'antimycine A qui, indépendamment de sa capacité à inhiber la phosphorylation oxydative, se lie à Bcl-2 en solution de manière compétitive avec un peptide Bak-BH3. L'ensemble des travaux présentés montrent que ces molécules, en inhi-

bant l'hétérodimérisation entre membres pro- et anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, induisent la mort cellulaire par activation directe de la voie apoptotique mitochondriale.

Fort logiquement, il paraît envisageable d'utiliser ces molécules en combinaison avec une chimiothérapie plus conventionnelle. Elles sont en effet susceptibles de restaurer la sensibilité au traitement de cellules par ailleurs résistantes en raison d'une expression accrue de Bcl-2/Bcl-xL [5]. Encore faut-il savoir si l'emploi de ces analogues va permettre d'inhiber l'intégrité des fonctions anti-apoptotiques des homologues de Bcl-2. La capacité des peptides BH3, ou de leurs analogues, à inhiber la formation de pores par Bcl-2/Bcl-xL, et l'interaction de ceux-ci avec des protéines mitochondriales doit, notamment, être établie de manière irréfutable (*figure 1*). L'emploi de ces molécules se présenterait alors comme une alternative intéressante à l'utilisation d'antisens de Bcl-2 (actuellement en phase III d'essais cliniques) et présenterait l'avantage de prendre pour cible non pas un, mais virtuellement tous les homologues anti-apoptotiques de Bcl-2.

Il est également fondamental d'identifier le *modus operandi* de ces molécules. Les domaines BH3 ne semblent en effet pas présenter d'activité cytotoxique intrinsèque, et l'induction de l'apoptose par leurs analogues est donc susceptible de dépendre de protéines endogènes. Il est notamment possible que ces molécules activent Bax ou Bak en les libérant d'hétérodimères inactifs (*figure 1*). Si c'est le cas, la perte d'expression de Bax par certaines cellules tumorales pourrait non seulement s'accompagner de chimiorésistance, mais aussi rendre inefficace le traitement par les analogues de BH3.

Malgré ces réserves, l'emploi de telles molécules semble prometteur. Deux études récentes indiquent en effet que des antagonistes de Bcl-2/Bcl-xL induisent plus efficacement l'apoptose des cellules transformées que des cellules saines [9, 10]. Cette sélectivité semble difficilement imputable à une surexpression de Bcl-2/Bcl-xL. Si une lignée hépatocytaire surexprimant Bcl-xL peut présenter une augmentation de sensibilité aux analogues de BH3 [8], la majorité des données obtenues par

ailleurs indiquent qu'une telle surexpression aurait plutôt un effet contraire. Il est, en revanche, tentant de proposer que cette sélectivité soit liée aux mécanismes mêmes de la transformation oncogénique. Les oncogènes qui sont de puissants inducteurs de la prolifération cellulaire ont en effet la capacité de sensibiliser les cellules à l'apoptose [1]. Dans le cas de c-Myc en particulier, ceci fait intervenir en premier lieu l'induction d'une perméabilisation mitochondriale [1]. Il est donc probable que l'activité anti-apoptotique des homologues de Bcl-2 soit davantage nécessaire à la survie de cellules qui portent une dérégulation oncogénique qu'à celle de cellules normales. Il reste à déterminer pleinement si l'activation de tels oncogènes sensibilise effectivement aux analogues de BH3, les mécanismes impliqués et le rôle joué notamment par le suppresseur de tumeur p53 dans ce processus. Ces données suggèrent toutefois que les petites molécules antagonistes de Bcl-2 pourraient être des outils bien adaptés pour induire l'apoptose préférentiellement au sein de cellules néoplasiques.

1. Juin P, Evan G. Caspase 8: the killer you can't live without. *Nat Med* 2000; 6: 498-500.
2. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-6.
3. Ionov Y, Yamamoto H, Krajewski S, Reed JC, Peruchio M. Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10872-7.
4. Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW, Vogelstein B. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* 2000; 290: 989-92.
5. Zheng TS. Death by design: the big debut of small molecules. *Nat Cell Biol* 2001; 3: E43-6.
6. Wang JL, Liu D, Zhang ZJ, *et al.* Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7124-9.
7. Degterev A, Lugovskoy A, Cardone M, *et al.* Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 173-82.
8. Tzung SP, Kim KM, Basanez G, *et al.* Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 183-91.
9. Wang JL, Zhang ZJ, Choksi S, *et al.* Cell permeable Bcl-2 binding peptides: a chemical approach to apoptosis induction in tumor cells. *Cancer Res* 2000; 60: 1498-502.
10. Sumantran VN, Lee DS, Woods Ignatoski KM, Ethier SP, Wicha MS. A bcl-xS adenovirus selectively induces apoptosis in transformed cells compared to normal mammary cells. *Neoplasia* 2000; 2: 251-60.

## Philippe Juin

*Inserm UMR 419, IFR 26, 9, quai Moncousu, 44035 Nantes Cedex, France.*