

# Apoptose

## Bad est-elle la protéine cible des facteurs de survie ?

Les différentes étapes impliquées dans le contrôle de la mort cellulaire programmée ou apoptose commencent à être bien décryptées. Les signaux de mort cellulaire aboutissent à un premier point de contrôle intracellulaire de l'apoptose assuré par les protéines de la famille Bcl-2, l'étape ultime étant probablement l'activation des protéases de la famille ICE [1, 2]. Jusqu'à présent les recherches se sont focalisées sur les différents signaux de mort cellulaire (système Fas/TNF, retrait de facteurs de croissance du milieu de culture, glucocorticoïdes, agents génotoxiques, certains produits d'oncogènes comme Myc, etc.), les différents membres de la famille Bcl-2 et ceux des protéases de type ICE, mais les relations moléculaires entre ces étapes n'ont pas été clairement établies. Deux articles récemment publiés dans la revue *Cell* permettent d'établir un premier lien entre un signal extérieur de mort cellulaire et le premier point de contrôle de l'apoptose assuré par les protéines de la famille Bcl-2.

Ces protéines appartiennent à une famille de gènes présentant des régions de séquences conservées, appelées BH pour *Bcl-2 homology domain* (figure 1). Cette famille est constituée de protéines à activité anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bag-1, Mcl-1, A1) ou pro-apoptotique (Bax, Bak, Bcl-x<sub>S</sub>, Bad). Les molécules anti-apoptotiques possèdent un domaine BH4 qui leur est spécifique.

Le mécanisme d'action de ces protéines est encore mal connu, mais il semble établi que la décision que prend une cellule de s'engager ou non dans la voie de l'apoptose est le résultat d'un équilibre fragile entre les formes pro-apoptotiques (essentiellement Bax et Bak) et les formes anti-apoptotiques (essentiellement

Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>), via des jeux multiples d'homo- ou d'hétérodimérisation [3]. Jusqu'à ce jour, les études analysaient pour la plupart le niveau d'expression de ces gènes (*Bax*, *Bak*, *Bcl-2*, *Bcl-x<sub>L</sub>*) et tentait de corrélérer le rapport des quantités des protéines pro et anti-apoptotiques à la capacité de la cellule de résister à l'apoptose ou de l'induire. Cependant, cette corrélation n'était pas toujours évidente [4]. Les deux articles de *Cell* [5, 6] montrent que l'état de phosphorylation des protéines de la famille Bcl-2, est important pour leur fonction et proposent un mécanisme expliquant comment un facteur de survie peut contrôler l'apoptose.

Les travaux de l'équipe de J. Korsmeyer *et al.* (Saint-Louis, MO, USA) suggèrent que la protéine Bad serait la cible des facteurs de survie. Bad est une protéine de la famille Bcl-2 qui,

contrairement à la plupart des autres membres de cette famille, ne possède pas de domaine d'ancrage membranaire (figure 1). Cette protéine interagit avec Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>, mais pas avec Bax [7]. La protéine Bad exercerait son rôle pro-apoptotique en se liant à Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> inhibant ainsi leur activité anti-apoptotique [7]. Le groupe de Korsmeyer a montré que la protéine Bad peut être phosphorylée sur deux sérines, Ser 112 et Ser 136, et que son état de phosphorylation joue un rôle essentiel dans sa localisation et sa fonction. En effet, Bad phosphorylée est liée à la protéine cytosolique 14-3-3 (*m/s* n° 12, vol. 12, p. 1430) et est ainsi séquestrée dans le cytosol. En revanche, Bad sous sa forme non phosphorylée se lie à Bcl-x<sub>L</sub> et, de ce fait, est localisée au niveau des membranes intracellulaires. En utilisant un système cellulaire dépendant de

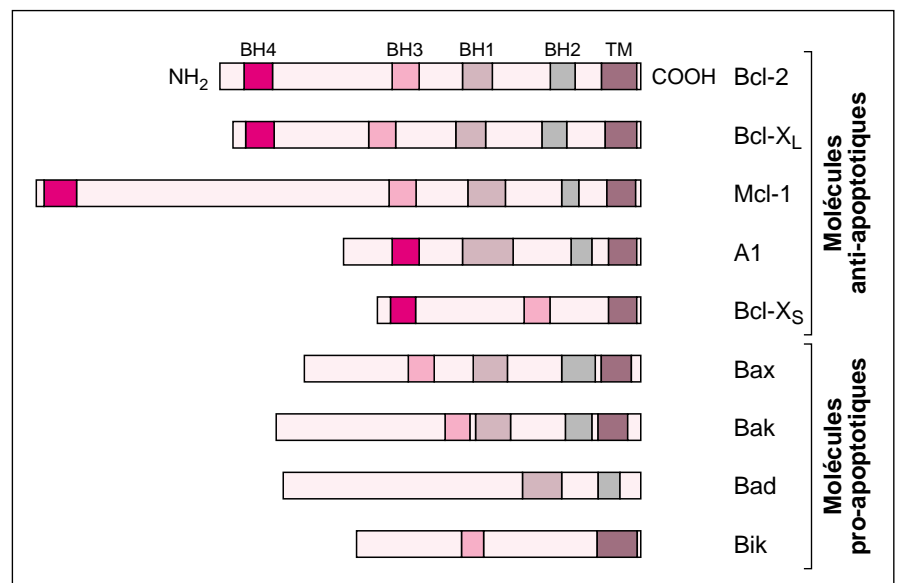


Figure 1. Comparaison de la structure des protéines de la famille Bcl-2. BH: *Bcl-2 homology domain*; TM: *domaine transmembranaire*. (D'après [10].)

l'IL-3 pour sa survie, les auteurs ont montré que des mutants de la protéine Bad dont les résidus sérine sont remplacés par des acides aminés non phosphorylables, ont une activité proapoptotique plus importante que la protéine Bad normale, confirmant que, *in vivo*, l'état de phosphorylation de Bad joue un rôle important dans le contrôle de l'apoptose. Ces auteurs proposent donc que Bad soit la protéine cible des facteurs de survie. En présence de facteurs de croissance, Bad serait phosphorylée et séquestrée dans le cytosol par la protéine 14-3-3, libérant ainsi Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> et leur permettant d'exercer leur action antiapoptotique. En absence de facteur de croissance, Bad ne serait pas phosphorylée, se lierait à Bcl-2 et à Bcl-x<sub>L</sub>, inhibant ainsi leur activité et conduisant la cellule à s'engager dans la voie de l'apoptose.

*In vivo*, la kinase responsable de la phosphorylation de Bad n'a pas encore été caractérisée. Cependant, le deuxième article indique qu'un des rôles de Bcl-2 serait d'ancrer la kinase Raf-1 à la membrane mitochondriale. Il est donc tentant de proposer que Raf-1 puisse être la kinase responsable de la phosphorylation de Bad. Dans cet article, le groupe de J.C. Reed (La Jolla, CA, USA) montre, par une approche similaire à celle utilisée dans le système d'activation de Ras qui aboutit au recrutement de Raf-1 à la membrane plasmique (*m/s* n° 2, vol. 10, p. 235; n° 10, vol. 11, p. 1501), que Bcl-2, par son domaine BH4 (figure 1), permet l'ancrage de Raf-1 à la membrane mitochondriale. Cette localisation semble un élément essentiel au contrôle de l'apoptose assuré par Bcl-2 car, dans un système cellulaire dont la survie dépend d'un facteur de croissance, la transfection par un vecteur d'expression d'une protéine Raf-1 ciblée à la membrane mitochondriale rend la cellule résistante à l'apoptose induite par la privation de ce facteur de croissance, alors qu'un vecteur codant pour un mutant inactif de Raf-1 diminue très fortement l'effet protecteur de Bcl-2 vis-à-vis de l'apoptose. Pour exercer ce rôle, seul le domaine catalytique de Raf-1 est nécessaire, et non le domaine d'interaction avec Ras. Les auteurs

ont ensuite cherché à mettre en évidence des substrats potentiels de Raf-1 *in vitro*: seule la protéine Bad, parmi les différents membres de la famille Bcl-2, est susceptible d'être phosphorylée par cette kinase. Cependant, les travaux du groupe de Korsmeyer suggèrent que, *in vivo*, une autre kinase que Raf-1 pourrait agir sur Bad. La suite de ce travail est, bien sûr, de caractériser les substrats de Raf-1 et, surtout, de comprendre comment Raf-1 est recrutée à la membrane mitochondriale indépendamment du système Ras dont le rôle est, après activation, de transférer Raf-1 à la membrane plasmique où sa dimérisation provoque l'activation de la voie des MAP kinases (*m/s* n° 12, vol. 12, p. 1430) [8].

Les travaux du groupe de J.C. Reed suggèrent donc que des protéines de la famille Bcl-2, ancrées à des structures membranaires intracellulaires, pourraient jouer le rôle de récepteurs pour les signaux émis dans la cascade d'événements contrôlant l'apoptose. Cependant de nombreuses questions restent posées.

- Comment Bcl-2 peut-il recruter Raf-1 à la membrane mitochondriale? Comment Raf-1 est-elle alors activée? De récents travaux du groupe de J.C. Reed suggèrent que Bag-1, protéine qui a été clonée grâce au système des doubles hybrides dans la levure en utilisant Bcl-2 comme appât et qui ne présente aucune analogie avec les autres membres de la famille, pourrait être responsable de l'activation

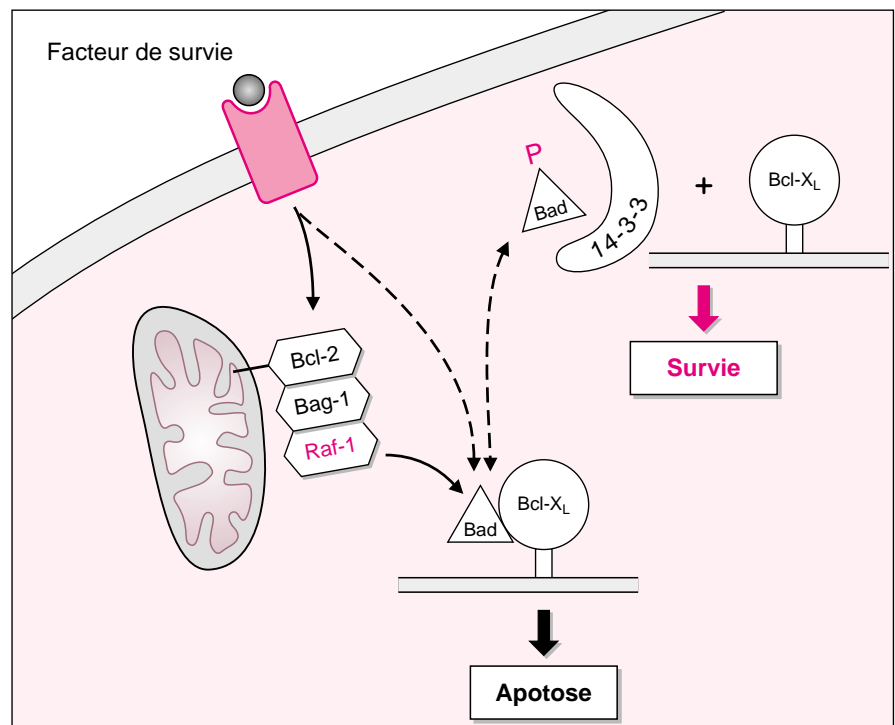


Figure 2. **Rôle d'un facteur de survie dans le contrôle de l'apoptose.** Bad serait la cible des facteurs de survie : sous sa forme non phosphorylée, il serait associé à Bcl-x<sub>L</sub>, au niveau des membranes intracellulaires; en revanche, sous sa forme phosphorylée, il serait séquestré par la protéine 14-3-3 dans le cytosol. La kinase physiologiquement chargée de phosphoryler Bad en réponse à un signal antiapoptotique et la phosphatase chargée de le déphosphoryler en réponse à un signal apoptotique, ne sont pas connues (trait pointillé). Pourrait-il s'agir de Raf-1, transféré à la membrane mitochondriale et activé en réponse à un signal de survie? Ce ciblage et cette activation pourrait impliquer non seulement Bcl-2, localisé à la membrane de la mitochondrie, mais aussi Bag-1, un autre partenaire de Bcl-2.

de Raf-1, éventuellement en l'amenant au voisinage de Bcl-2 [9]. Si cette hypothèse est correcte, Bag-1 pourrait être la cible des facteurs de croissance, mais cette éventualité reste à ce stade purement spéculative. • On peut également se demander si Bad est phosphorylée, *in vivo*, de façon directe ou indirecte par Raf-1 ou bien si cette phosphorylation implique, physiologiquement, des voies indépendantes de Raf-1. Mais, dans ce cas, quel serait la conséquence de son recrutement par Bcl-2 à la membrane mitochondriale? En conclusion, ces deux articles proposent un mécanisme expliquant comment un facteur de survie, facteur de croissance, peut contrôler l'apoptose en prenant comme cible certaine protéine de la famille Bcl-2 et établissent un lien entre un signal émettant un message de mort et le premier point de contrôle intracellulaire de l'apoptose assuré par les protéines de la famille Bcl-2 (figure 2) ■

## RÉFÉRENCES

1. White E. Life, death and pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 1996; 10: 1-15.
2. Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2239-44.
3. Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 1996; 79: 189-92.
4. Gajewski TF, Thompson CB. Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence. *Cell* 1996; 86: 589-92.
5. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-xL. *Cell* 1996; 87: 619-28.
6. Wang HG, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 1996; 87: 629-38.
7. Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC. Cloning and functional analysis of BAG-1 a novel Bcl-2 binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 1995; 80: 279-84.
8. Kahn A. La transmission du signal en amont et en aval de Ras. *Med Sci* 1992; 8: 1097-9.
9. Wang HG, Takayama S, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 interacting protein BAG-1 binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7063-6.
10. Zha H, Aimé-Sempé C, Sato T, Reed JC. Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J Biol Chem* 1996; 271: 7440-4.

**Alix de La Coste  
Christine Perret**

*Inserm U. 129, Laboratoire de recherche en physiologie et pathologie génétiques et moléculaires, ICGM, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.*

## TIRÉS À PART

A. de La Coste.

## ■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Apoptose indépendante des protéases de la famille ICE.** Parmi les membres de la famille Bcl2 à activité pro-apoptotique, Bax joue probablement un rôle central [1]. L'idée généralement admise est que les différents signaux apoptotiques d'une cellule convergent vers l'activation d'une cascade de protéases appartenant à la famille de l'enzyme de conversion de l'interleukine 1 $\beta$ , la famille ICE (maintenant appelée CASPASE). Les cibles de ces protéases sont probablement nombreuses, sans que l'on sache lesquelles sont essentielles; à ce jour, on a décrit un clivage, par les protéases ICE activées, de la poly (ADP ribose) polymérase, des facteurs de transcription SREBP, de la protéine

Rb, du facteur inhibiteur de l'activation des petites protéines G de la famille Rho, de l'isoforme C $\delta$  de la protéine kinase C, etc. Xiang *et al.*, du laboratoire de Korsmeyer (Saint-Louis, MO, USA) montrent maintenant qu'une hyperexpression de la protéine Bax, induite par l'intermédiaire d'un vecteur d'expression d'activité conditionnelle, peut entraîner des stigmates d'apoptose et de mort cellulaire même dans des conditions où l'activation de la cascade ICE est bloquée par des peptides inhibiteurs spécifiques [2]. Par conséquent, Bax semble entraîner deux types de phénomènes. L'activation de la cascade ICE, aboutissant au clivage de plusieurs protéines cibles et associée à la fragmentation

de l'ADN; et, indépendamment de ce phénomène, d'autres anomalies marquées par une diminution du potentiel de la membrane des mitochondries, une augmentation de la concentration des radicaux actifs de l'oxygène, une condensation de l'ADN, la vacuolisation du cytoplasme, une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique. Ce dernier ensemble de phénomènes est suffisant pour provoquer la mort cellulaire, même lorsque la cascade des protéases ICE est bloquée.

[1. Martinou J. *Med Sci* 1995; 11: 367-73.]

[2. Xiang J, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14559-63.]