

MÉCANISMES DE RÉGULATION DE L'APOPTOSE: IMPLICATION DANS LE TRAITEMENT DES CANCERS

MOLECULAR CONTROL OF APOPTOSIS: IMPLICATIONS IN CANCER THERAPY

Estelle Schmitt et Richard Bertrand

Apoptosis is a genetically controlled process of cell death. Defective control of apoptosis contributes to malignancy and anticancer drug resistance. The two best-studied models of apoptosis activation, the mitochondria pathway and the cell death receptor pathway will be described. Molecular control of apoptosis involves series of cell death genes, primarily the Ced-9/ Egl-1/Bcl, Ced-4/Apaf-1 and Ced-3/Ice/caspase. The central role of the Ced-9/Egl-1/Bcl family members in controlling the mitochondria pathway of apoptosis has become eminently apparent. Although, the precise molecular mechanisms triggered by apoptosis-inducing agents used in cancer therapy remain unknown, most studies strongly suggest that the mitochondria pathway play the central role in cell death induced by genotoxic drugs. Understanding the function and mode of action of the proteins of the Ced-9/Egl-1/Bcl family may help develop new cancer therapeutic strategies to circumvent drug resistance.

L'apoptose est un processus de mort cellulaire contrôlé génétiquement. Des dérégulations de l'apoptose sont impliquées dans la carcinogénèse et constituent une nouvelle forme de résistance aux traitements anticancéreux. Actuellement deux voies principales d'activation de l'apoptose sont décrites, la voie mitochondriale et la voie des récepteurs de mort cellulaire. La régulation et l'activation de l'apoptose implique plusieurs familles de protéines dont les protéines de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl, Ced-4/Apaf-1 et Ced-3/Ice/caspase. L'étude de la fonction et du mode d'action des protéines de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl a révélé leur rôle central dans le contrôle de l'apoptose mitochondrie-dépendante. Les mécanismes moléculaires par lesquels les agents anticancéreux transmettent les signaux de mort cellulaire sont encore peu connus mais les études effectuées au cours des dernières années suggèrent que ces signaux convergent vers les mitochondries qui jouent un rôle central dans l'initiation de l'apoptose induite par les drogues anticancéreuses. Une meilleure compréhension de la fonction et du mode d'action des protéines de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl dans la mort cellulaire programmée devrait permettre d'améliorer l'efficacité des agents cytotoxiques utilisés dans le traitement des cancers ou de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

INTRODUCTION

L'apoptose ou mort cellulaire programmée, est un processus de mort cellulaire physiologique qui permet à l'organisme d'éliminer les cellules non désirées ou endommagées et potentiellement dangereuses. Elle joue un rôle crucial dans le développement des organismes pluricellulaires et le maintien de l'homéostasie cellulaire qui résulte d'un équilibre contrôlé entre la prolifération et la mort cellulaire (Kerr et al., 1972; Wyllie, 1987). L'apoptose est un processus contrôlé génétiquement qui est activé par des stimuli physiologiques normaux, intra ou extracellulaires mais également par

des stimuli pathologiques qui portent atteinte au bon fonctionnement de la cellule tels que, par exemple, une infection virale, un choc thermique, un stress oxydatif ou des dommages induits à l'ADN. Des dérégulations de l'apoptose, qui aboutissent à une mort cellulaire excessive ou insuffisante, sont impliquées dans certaines pathologies humaines telles que les maladies neurodégénératives, le SIDA, les maladies autoimmunes ou encore le cancer (Thompson, 1995). La mort cellulaire par apoptose est caractérisée par des altérations morphologiques spécifiques. Parmi ces altérations on peut observer une réduction du volume cytoplasmique, la condensation de la chromatine au niveau de la membrane nucléaire, une perte d'asymétrie de la membrane plasmique et la fragmentation de l'ADN. La cellule entière finit par être démantelée sous forme de vésicules ou corps apoptotiques qui contiennent le cytoplasme, les organelles cellulaires ainsi que la chromatine fragmentée. Contrairement aux cellules nécrotiques qui déversent leur contenu dans le milieu

Centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM). Hôpital Notre-Dame, Institut du cancer de Montréal (porte Y 5634), 1560 rue Sherbrooke est, Montréal (Qué) Canada H2L 4M1.

Téléphone: (514) 281 6000 ext 6615

Fax: (514) 896 4689

courriel: richard.bertrand@umontreal.ca

extracellulaire, les cellules en apoptose sont rapidement reconnues et phagocytées par les cellules avoisinantes sans susciter de réaction inflammatoire (Kerr et al., 1972; Savill, 1998; Wyllie et al., 1980). L'apoptose est également caractérisée par des altérations biochimiques majeures. Parmi ces altérations on peut observer une perte des fonctions mitochondriales, la libération de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux tels que le cytochrome c ou l'AIF (*apoptosis inducing factor*) et enfin, l'activation des caspases et la protéolyse de substrats cellulaires spécifiques (Nicholson, 1999; Susin et al., 1998).

En oncologie, l'intérêt porté à l'apoptose provient des observations indiquant que l'apparition et la croissance des tumeurs ne sont pas uniquement la conséquence d'une prolifération cellulaire excessive mais sont le résultat d'un déséquilibre entre la prolifération et la mort cellulaire (Martin and Green, 1995; Reed, 1999). Dans les thérapies anticancéreuses, les radiations ionisantes ainsi que la plupart des drogues utilisées en chimiothérapie induisent l'apoptose dans les cellules tumorales. Des altérations au niveau des gènes impliqués dans le contrôle de l'apoptose peuvent modifier la réponse cellulaire aux agents anticancéreux et rendre les cellules résistantes aux traitements (Hickman, 1996; Reed, 1995; Schmitt et al., 1997). L'efficacité d'une drogue dépend non seulement de sa capacité d'induire des lésions toxiques dans les cellules malignes mais également de la capacité des cellules de détecter et de répondre aux dommages. Des drogues ayant des mécanismes d'action différents peuvent induire la même réponse cellulaire qui aboutit à l'activation de l'apoptose. Ainsi, un dérèglement de l'apoptose ou de son contrôle peut aboutir à une résistance multidroge (Schmitt and Lowe, 1999). Dans cette revue nous décrirons les principales voies d'activation de l'apoptose induites par les agents anti-cancéreux. Nous discuterons en particulier de la fonction et du mode d'action de certaines protéines de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl, une famille de protéines qui assure un point de contrôle majeur de la mort cellulaire programmée.

LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE EST UN PROCESSUS CONSERVÉ AU COURS DE L'ÉVOLUTION

Des études génétiques réalisées chez le nématode *Caenorhabditis elegans* ont permis d'identifier quatre gènes centraux impliqués dans la régulation de l'apoptose au cours du développement du nématode. Parmi ces gènes, *ced-4* et *ced-3* (*cell death abnormal*) sont requis pour l'initiation et l'exécution de

l'apoptose. Le gène *ced-9* agit en amont des gènes *ced-4* et *ced-3* et inhibe leurs activités pro-apoptotiques. Récemment, le gène *egl-1* (*egg-laying defective*) a été identifié. *Egl-1* agit en amont des gènes *ced-9*, *ced-4* et *ced-3* et régule négativement l'activité de *ced-9* (Metzstein et al., 1998). Des analyses fonctionnelles et des études d'interaction des produits de ces gènes ont permis de définir un modèle d'activation de l'apoptose chez *C. elegans*. Dans ce modèle, la protéine Ced-3 est la protéine effectrice de l'apoptose. La protéine Ced-4 interagit avec Ced-3 et permet l'activation de Ced-3 et l'initiation de l'apoptose. L'activation de Ced-3 par Ced-4 est inhibée par la protéine Ced-9 qui séquestre Ced-4 et/ou le complexe Ced-4/Ced-3 au niveau des membranes intracellulaires. Suite à un stimulus de mort cellulaire, la protéine Egl-1 interagit avec Ced-9, permettant ainsi l'activation de la protéase Ced-3 par Ced-4 dans le cytoplasme (Metzstein et al., 1998) (Figure 1).

Les homologues des gènes *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* et *egl-1* ont été identifiés chez les mammifères. La protéine Ced-3 appartient à la famille des protéases à cystéine ou caspases, dont on connaît actuellement 14 membres. Ced-9 et Egl-1 présentent des homologies avec le proto-oncogène Bcl-2 qui est le premier membre identifié d'une grande famille de protéines régulatrices de l'apoptose et enfin, Ced-4 est l'homologue de Apaf-1 (*apoptosis activating factor*), Flash et Nod-1/Card-4, identifiés récemment (Bertin et al., 1999; Imai et al., 1999; Inohara et al., 1999; Zou et al., 1997). Des études récentes ont révélé que ces familles de protéines identifiées chez les mammifères, présentent également des homologies fonctionnelles avec les protéines régulatrices de l'apoptose du nématode, et suggèrent que certains des mécanismes fondamentaux de la mort cellulaire programmée sont conservés au cours de l'évolution. En effet, dans les cellules de mammifères, les Ced-3/Ice/caspases sont les protéines effectrices de l'apoptose alors que les Ced-9/Egl-1/Bcl agissent en amont et régulent l'activation des caspases. Apaf-1 et Nod-1/ Card-4, homologues humains de Ced-4, interagissent avec le précurseur de la caspase-9 et l'activent. L'activation de la caspase-9 par Apaf-1 est régulée négativement ou positivement par les différents membres de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl (Hu et al., 1998; Li et al., 1998; Li et al., 1997; Luo et al., 1998; Pan et al., 1998) (Figure 1). Si le schéma général d'activation de l'apoptose est conservé entre nématodes et mammifères, la multiplicité des gènes impliqués dans l'apoptose chez les mammifères augmente le niveau de complexité des mécanismes de

régulation de la mort cellulaire programmée chez les organismes supérieurs.

LES PROTEINES DE LA FAMILLE DES CED-9/EGL-1/BCL

Aujourd'hui plus de 19 membres de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl ont été identifiées chez les mammifères. Certains exercent une fonction anti-apoptotique analogue à Ced-9 mais d'autres ont une activité pro-apoptotique. Ces protéines présentent toutes des homologies avec Bcl-2 au niveau de régions conservées appelées domaines BH (*Bcl-2 homology domain*). Les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A-1/Bfl-1, et Diva/Boo présentent le plus d'homologies avec Bcl-2 et une combinaison variable de domaines BH. Les protéines pro-apoptotiques sont divisées en deux sous-groupes. Le premier groupe comprend Bax, Bcl-xS, Bak et Bok/Mtd qui possèdent au-moins deux domaines BH. Le second groupe comprend les protéines Bad, Bik/Nbk/mBlk, Bid, Hrk/Dp5, Bim/Bod, Noxa, Nip1, Nip3 et les homologues Bnip3L/Bnip3a/Nix. Ces protéines possèdent un domaine d'homologie unique, le domaine BH3 et sont les homologues fonctionnels de Egl-1 (Boyd et al., 1994; Chen et al., 1999; Inohara et al., 1998; Matsushima et al., 1998; O'Reilly and Strasser, 1999; Oda et al., 2000; Song et al., 1999; Yasuda et al., 1999) (Figure 2).

La majorité des membres de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl possèdent une extrémité C-terminale hydrophobe qui leur confère une localisation membranaire. Bcl-2 et Bcl-xL sont essentiellement localisés au niveau de la membrane mitochondriale, la membrane nucléaire et au niveau du réticulum endoplasmique alors que Bax- α a surtout une localisation cytosolique (Hsu et al., 1997; Krajewski et al., 1993). Des expériences de délétion des domaines C-terminaux de Bax- α et Bcl-2 suggèrent que la localisation de ces protéines au niveau de sites stratégiques dans la cellule, contribue à leurs fonctions. Des études récentes mettent en évidence une redistribution de la protéine Bax- α du cytoplasme vers les mitochondries suite à un stimulus de mort cellulaire. L'insertion de Bax- α dans la membrane mitochondriale est nécessaire à son activité pro-apoptotique et entraîne la libération de cytochrome c et l'activation des caspases. Cette translocation implique une homodimérisation et/ou des changements conformationnels de la protéine et semble être favorisée par un facteur cytoplasmique inhibé par Bcl-2 (Gross et al., 1998; Nechushtan et al., 1999; Nomura et al., 1999). L'activation de la protéine pro-apoptotique Bid au niveau du récepteur

de mort cellulaire CD95/Apo-1/Fas entraîne également une redistribution de Bid du cytoplasme vers les mitochondries où elle exerce sa fonction (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). La protéine Bad, quant à elle, exerce une activité pro-apoptotique en interagissant avec Bcl-xL au niveau de la mitochondrie. En réponse à l'IL-3, des signaux de survie sont transmis dans la cellule. Ces signaux entraînent la phosphorylation de Bad et la translocation de la protéine de la mitochondrie vers le cytoplasme où elle est séquestrée par la protéine 14-3-3 (Franke and Cantley, 1997). L'ensemble de ces données suggère que le déplacement des protéines Ced-9/Egl-1/Bcl d'un compartiment cellulaire à un autre, joue un rôle essentiel dans leur fonction et permet la transduction de signaux de mort cellulaire du cytoplasme vers les sites d'initiation de l'apoptose tels que la mitochondrie (Figure 3).

Les membres de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl peuvent former des homodimères, ou des hétérodimères avec des partenaires spécifiques de fonction opposée (Sedlak et al., 1995). Les domaines BH-1 et BH-2 des protéines anti-apoptotiques et le domaine BH-3 des protéines pro-apoptotiques sont impliqués dans la formation d'hétérodimères. D'après l'analyse de la structure de Bcl-xL et les homologies de séquences entre Bcl-xL et les autres membres de la famille, les domaines BH-1, -2 et -3 des Ced-9/Bcl anti-apoptotiques forment une région hydrophobe en forme de clé qui constitue le site d'interaction des Ced-9/Egl-1/Bcl pro-apoptotiques (Muchmore et al., 1996). Des expériences de mutagenèse dirigée au niveau des domaines BH-1 et BH-2 de Bcl-2 et Bcl-xL, ainsi que des expériences de délétion du domaine BH-3 de Bak ou Bad, montrent une corrélation entre l'activité anti- ou pro-apoptotique de ces protéines et leur capacité de former des hétérodimères. Lorsque la protéine Bax- α est surexprimée, les cellules sont davantage sensibles à un stimulus de mort cellulaire. Quand les cellules surexpriment à la fois Bax- α et Bcl-2 ou Bcl-xL, l'effet pro-apoptotique de Bax- α est neutralisé par la formation d'hétérodimères Bcl-2-Bax- α ou Bcl-xL-Bax- α . La protéine Bad, quant à elle, favorise l'apoptose induite par Bax- α en interagissant avec Bcl-xL et en restaurant ainsi l'activité de Bax- α . Ces résultats ont suggéré un modèle selon lequel le niveau d'expression des protéines Ced-9/Egl-1/Bcl pro-apoptotiques par rapport aux protéines Ced-9/Bcl anti-apoptotiques détermine la sensibilité des cellules à un stimulus de mort cellulaire (Yang and Korsmeyer, 1996; Yang et

al., 1995). Bien que les interactions entre les protéines de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl jouent un rôle important dans leur fonction, d'autres études de mutations ou délétions des domaines BH, ainsi que des études génétiques, montrent que Bcl-xL, Bcl-2, Bak et Bax- α , peuvent réguler l'apoptose de façon indépendante.

Plusieurs interactions directes ou indirectes entre certaines protéines de la famille des Ced-9/Bcl et des protéines non homologues ont été mises en évidence, mais la signification biologique de ces interactions est souvent peu ou pas connue. Suite à un stimulus de mort cellulaire, la formation du complexe Apaf-1/procaspase-9 au niveau de la mitochondrie induit l'activation de la procaspase-9 et l'initiation de la cascade apoptotique. Certains travaux ont montré une interaction entre la protéine anti-apoptotique Bcl-xL et le complexe Apaf-1/procaspase-9. Ces résultats, ainsi que les études effectuées chez le nématode *C. elegans* ont suggéré un modèle selon lequel l'interaction Bcl-xL-Apaf-1 entraîne la séquestration du complexe Apaf-1/procaspase-9 au niveau de la membrane mitochondriale et inhibe ainsi l'activation de la cascade apoptotique (Hu et al., 1998; Li et al., 1997). Des études plus récentes de localisation intracellulaire des protéines Apaf-1, Bcl-xL et Bcl-2, ont cependant remis en question ce modèle (Hausmann et al., 2000). D'autres travaux mettent en évidence une interaction entre Bcl-2 et la sérine/thréonine kinase Raf-1 ou les GTPases R-, H-, N-, et K-Ras. Ces interactions provoquent le recrutement de Raf-1 et des différentes formes de Ras au niveau de la mitochondrie (Rebollo et al., 1999; Wang et al., 1996). Bcl-2 interagit également avec la protéine Bag-1, la protéine phosphatase calcineurine, et p53-Bp2, une protéine de liaison à p53 (Reed, 1997). Au niveau du réticulum endoplasmique, Bcl-2 ainsi que Bcl-xL interagissent avec la protéine p28 Bap31 (Ng et al., 1997). Récemment, une interaction directe entre la protéine pro-apoptotique Bax- α et les protéines ANT (*adenine nucleotide translocator*) et VDAC (*voltage dependent anion channel*) qui composent les mégacanaux mitochondriaux a été montrée. Ces interactions semblent favoriser l'ouverture des mégacanaux et la libération de cytochrome c, un événement précoce dans l'initiation de l'apoptose (Marzo et al., 1998; Shimizu et al., 1999; Shimizu and Tsujimoto, 2000). Au contraire, la liaison des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Bcl-2 à VDAC semble favoriser la fermeture des mégacanaux et empêcher la libération du cytochrome c (Shimizu et al., 2000; Shimizu et al., 1999).

L'analyse tridimensionnelle de Bcl-xL révéla une analogie de structure avec les domaines de formation de canaux ioniques de certaines toxines bactériennes telles que la colicine A et E1 et la toxine diphtérique. Le domaine d'insertion dans les membranes de Bcl-xL est appelé domaine PFD (*pore forming domain*) et est essentiellement constitué de deux hélices- α hydrophobes situées entre les domaines BH-1 et BH-2 de la protéine (Muchmore et al., 1996).

Par la suite, une série d'études électrophysiologiques démontrèrent la capacité de Bcl-xL, Bcl-2, et Bax- α de former des canaux ioniques dans des membranes artificielles. Ces canaux sont sensibles au potentiel membranaire ainsi qu'au pH et démontrent des caractéristiques dynamiques différentes. Les canaux formés par les protéines anti-apoptotiques semblent plus perméables aux cations alors que ceux formés par les protéines pro-apoptotiques sont plus perméables aux anions (Schendel et al., 1998). Bien que l'activité de canal de Bcl-2, Bcl-xL et Bax- α n'ait pas été démontrée *in vivo*, des études de mutation de leurs domaines PFD respectifs suggèrent qu'elle participe à leur fonction. La localisation membranaire des protéines Bax- α , Bcl-2 et Bcl-xL et leur activité potentielle de canal, permettent d'envisager l'hypothèse que ces protéines contrôlent l'apoptose en régulant les efflux d'ions au niveau des membranes intracellulaires. Cette hypothèse est supportée par un certain nombre de données. Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL inhibent l'apoptose en stabilisant le potentiel transmembranaire des mitochondries ($\Delta\Psi_m$), alors que la protéine pro-apoptotique Bax- α exerce l'effet opposé et favorise la chute de $\Delta\Psi_m$ (Kroemer and Reed, 2000; Kroemer et al., 1997). D'autres études mettent également en évidence une corrélation entre l'inhibition de l'apoptose par Bcl-2 et la régulation des flux intracellulaires de calcium ainsi que la redistribution cytosol/ noyau du glutathione (Voehringer et al., 1998; Zhu et al., 1999).

LES PROTEINES DE LA FAMILLE DES CED-3/ICE/CASPASES

A ce jour 14 caspases (*cysteiny aspartate-specific proteinase*) ont été identifiées chez les mammifères. Les caspases peuvent être divisées en deux familles selon leur degré d'homologie avec ICE/caspase-1 (*interleukin-1 converting enzyme*) ou Ced-3/caspase-3. La première famille qui comprend caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13, et -14 semble principalement impliquée dans le processus de maturation des cytokines à l'exception de la caspase-12. Les caspases possédant une plus grande

homologie avec Ced-3, c'est à dire caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9, et -10, jouent un rôle central dans l'apoptose (Alnemri, 1997). Les caspases sont des protéases à cystéine et possèdent une séquence QACxG conservée qui contient la cystéine catalytique. Elles sont synthétisées dans les cellules sous forme de précurseurs inactifs communément appelés procaspases. Les procaspases sont activées par un clivage protéolytique au niveau d'au moins deux résidus Asp conservés. Cette protéolyse libère la grande et la petite sous-unité de l'enzyme et permet la formation d'un hétérodimère catalytiquement actif. Etant donné que les caspases clivent spécifiquement leurs substrats au niveau d'un résidu Asp, elles ont la capacité de s'autoactiver et/ou de s'activer mutuellement, ce qui aboutit à une activation protéolytique en cascade.

En plus de leurs sous-unités actives, les procaspases possèdent un prodomaine de longueur variable à leur extrémité NH₂-terminale. Ces prodomaines permettent de diviser les caspases en deux sous-groupes: Les caspases initiatrices de l'apoptose (caspases-2, -8, -9, et -10) qui ont des prodomaines longs et les caspases effectrices (caspase-3, -6 et -7), qui ont des prodomaines courts. Les prodomaines des caspases initiatrices contiennent des séquences spécifiques d'interaction protéine-protéine tel que le domaine CARD (*caspase recruitment domain*) ou le domaine DED (*death effector domain*). Ces séquences permettent aux procaspases d'être recrutées par des protéines adaptatrices au niveau des complexes d'initiation de l'apoptose. Le recrutement des procaspases initiatrices au niveau de sites spécifiques entraîne l'oligomérisation des proenzymes et leur activation par autocatalyse (Kumar and Colussi, 1999). Ainsi, l'activation du récepteur de mort cellulaire CD95/Apo-1/Fas entraîne le recrutement de la procaspase-8 par les protéines adaptatrices Fadd/Mort-1 ou Flash pour former le DISC (*death inducing signaling complex*). L'interaction Fadd/Mort-1/procaspase-8, qui implique les domaines DED présents sur les deux protéines, permet l'activation de la procaspase-8 et l'initiation de la cascade protéolytique qui mène à l'apoptose. De façon similaire, la protéase Ced-3 de *C. elegans* et la procaspase-9, se lient respectivement aux protéines adaptatrices Ced-4 et Apaf-1 ou Card-4/Nod-1 par des interactions CARD-CARD. Ces interactions entraînent l'oligomérisation des protéases et leur activation en présence de cofacteurs (Chinnaiyan et al., 1997; Kumar, 1999).

Une fois les caspases initiatrices activées au niveau des complexes d'initiation de l'apoptose, celles-ci

clivent et activent les caspases effectrices dans une réaction en cascade qui amplifie le signal. Les caspases effectrices clivent à leur tour des substrats spécifiques dans la cellule, ce qui aboutit aux changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose. Les substrats des caspases peuvent être inactivés par la protéolyse, c'est le cas, par exemple, de certaines protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité du génome (PARP, ATM, DNA-PK), des protéines du cytosquelette (fodrin, actin, lamine), de l'inhibiteur de l'endonucléase DFF40/CAD (DFF45/ICAD) ou des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL. D'autres protéines cellulaires telles que Bid ou la kinase MEKK1 peuvent être activées par les caspases et leur protéolyse contribue à amplifier les signaux de mort cellulaires (Nicholson, 1999). L'activation des caspases à un niveau critique apparaît comme le point de non-retour du processus apoptotique et le clivage protéolytique, par les caspases, de substrats cellulaires, est nécessaire à l'accomplissement de la phase ultime de l'apoptose.

LA MITOCHONDRIE

Les mitochondries jouent un rôle central dans l'activation de l'apoptose. L'ouverture des mégacanaux mitochondriaux dits "*mitochondrial permeability transition pores*", la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) ainsi que la translocation de protéines apoptogéniques de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytoplasme a été mis en évidence dans la plupart des cellules en apoptose. Ces changements au niveau des mitochondries sont des événements précoces qui induisent l'activation des caspases suite à un stimulus de mort cellulaire (Kroemer et al., 1997; Susin et al., 1998). Parmi les facteurs apoptogéniques qui sont relâchés par les mitochondries on peut citer cytochrome c, AIF (*apoptosis inducing factor*) ainsi que certaines procaspases telles que procaspase-9, -3 et -2 (Susin et al., 1999; Susin et al., 1998). Le relâchement de ces protéines ainsi que les autres altérations observées au niveau des mitochondries, sont régulés par les protéines de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl (Vander Heiden and Thompson, 1999).

L'utilisation d'un système acellulaire a permis au groupe de X. Wang de déterminer trois facteurs nécessaires à l'activation de l'apoptose. Ces trois facteurs sont la protéine mitochondriale cytochrome c, Apaf-1, un homologue humain de Ced-4 et la procaspase-9 (Li et al., 1997; Liu et al., 1996; Zou et al., 1997). Dans un extrait cytosolique, en présence de dATP, Apaf-1, cytochrome c et la

procaspase-9 forment un complexe trimoléculaire, appelé apoptosome, qui induit l'activation de la procaspase-9. La liaison de cytochrome c à Apaf-1 permet l'oligomérisation de Apaf-1 et le recrutement de la procaspase-9 par des interactions entre les domaines CARD présents chez les deux protéines. L'agrégation de plusieurs molécules de procaspase-9 au niveau de l'apoptosome entraîne l'activation de la procaspase-9 par autocatalyse (Li et al., 1997; Srinivasula et al., 1998). Une fois activée, la caspase-9 amplifie le signal de mort cellulaire en activant les caspases-3 et -7 qui à leur tour activent d'autres caspases en aval dans la cascade apoptotique (Figure 3). L'activation en cascade des caspases induite par cytochrome c aboutit au clivage de substrats spécifiques et à la fragmentation de noyaux exogènes incubés dans l'extrait (Li et al., 1997; Slee et al., 1999). L'activation de l'apoptose par le complexe Apaf-1/ caspase-9 a également été mise en évidence *in vivo* ainsi que dans les cellules en culture. Les souris déficientes du gène *apaf-1* ou *caspase-9* présentent des anomalies développementales majeures au niveau du système nerveux central, dues à une diminution de la mort cellulaire par apoptose au cours de la différenciation neuronale. Les thymocytes dérivés des souris *apaf-1* *-/-* ou *caspase-9* *-/-* démontrent une résistance à l'apoptose induite par l'étoposide et les radiations ionisantes (Cecconi et al., 1998; Hakem et al., 1998; Kuida et al., 1998; Yoshida et al., 1998). D'autre part, la surexpression de Apaf-1 dans les cellules promyélocytiques humaines HL-60, sensibilise les cellules à l'apoptose induite par le taxol et l'étoposide en favorisant l'activation des caspases-9 et -3 (Perkins et al., 1998). Cytochrome c est localisé dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie et sa translocation dans le cytoplasme est en général nécessaire à l'activation des caspases et l'initiation de l'apoptose. La libération de cytochrome c, suite à un stimulus de mort cellulaire, est contrôlée par les protéines de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl. Les protéines qui exercent une activité anti-apoptotique, telles que Bcl-2 et Bcl-xL, inhibent la libération de cytochrome c et l'activation subséquente des caspases, alors que celles qui exercent une activité pro-apoptotique, telles que Bax- α , Bak ou Bid, favorisent sa libération (Kluck et al., 1997; Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Rosse et al., 1998; Yang et al., 1997). La protéine anti-apoptotique Bcl-xL inhibe également l'activation de la procaspase-9 en interagissant avec le complexe cytochrome c/Apaf-1/procaspase-9 et cette interaction est antagonisée par les protéines pro-apoptotiques telles que Bax- α ou Bak (Hu et al., 1998).

Le mécanisme par lequel cytochrome c quitte l'espace intermembranaire de la mitochondrie après un stimulus de mort cellulaire est encore obscure. L'ouverture des mégacanaux mitochondriaux et la chute du potentiel transmembranaire ($\Delta\Psi_m$) de la mitochondrie sont des événements souvent associés à la libération de cytochrome c et peuvent être régulés positivement ou négativement par les protéines de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl (Kluck et al., 1997; Rosse et al., 1998; Yang et al., 1997; Zamzami et al., 1996). La chronologie des altérations mitochondriales induites par un stimulus de mort cellulaire reste cependant controversée et la libération de cytochrome c peut précéder ou succéder la chute du potentiel transmembranaire de la mitochondrie, selon les systèmes utilisés (Goldstein et al., 2000; Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997; Zamzami et al., 1996).

Des études récentes suggèrent que certaines protéines de la famille des Ced-9/Bcl, telles que Bax- α , Bak, Bcl-2 ou Bcl-xL, régulent la libération de cytochrome c en modulant l'activité des mégacanaux mitochondriaux (Marzo et al., 1998; Shimizu et al., 2000; Shimizu et al., 1999; Shimizu and Tsujimoto, 2000). Les mégacanaux mitochondriaux sont localisés au niveau des sites d'interaction de la membrane interne et externe de la mitochondrie. Ce sont des complexes multiprotéiques dont les composants centraux sont la translocase de nucléotides adényliques (ANT) et le canal anionique voltage-dépendant (VDAC) qui sont impliqués dans l'échange ADP/ATP entre la matrice mitochondriale et le cytoplasme. Suite à un stimulus de mort cellulaire, la transition de perméabilité, caractérisée par l'ouverture des mégacanaux mitochondriaux, induit la dissipation du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) et la rupture de l'homéostasie ionique et osmotique de la mitochondrie. Ces événements entraînent le gonflement de la matrice mitochondriale, la rupture de la membrane externe et la libération de cytochrome c et d'autres protéines localisées dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Vander Heiden et al., 1997). Des études récentes suggèrent que les protéines Bax- α et Bcl-2, favorisent ou inhibent respectivement la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial et la libération de cytochrome c en interagissant avec la protéine ANT des mégacanaux mitochondriaux et en modulant son activité de canal (Brenner et al., 2000; Marzo et al., 1998). D'autres travaux publiés récemment suggèrent que certaines protéines de la famille des Ced-9/ Bcl régulent la perméabilité des membranes mitochondriales et la

libération de cytochrome c en interagissant avec la protéine VDAC des mégacanaux mitochondriaux. En effet, la reconstitution de l'activité canal de VDAC dans des liposomes a permis de montrer que les protéines pro-apoptotiques Bax- α et Bak favorisent l'ouverture de VDAC et permettent le passage de cytochrome c à travers le canal alors que les protéines Bcl-xL et Bcl-2 maintiennent le canal dans une conformation fermée, imperméable à cytochrome c (Shimizu et al., 2000; Shimizu et al., 1999; Shimizu and Tsujimoto, 2000). Une autre étude réalisée par le même groupe, montre que les protéines pro-apoptotiques Bid et Bik qui possèdent un domaine BH-3 unique, induisent la libération de cytochrome c indépendamment de la perméabilité de transition. Ces résultats permettent de mieux comprendre les données contradictoires concernant le rôle de $\Delta\Psi_m$ dans l'initiation de l'apoptose. Selon le stimulus apoptotique que perçoit la cellule, différents membres pro-apoptotiques de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl transmettent le signal de mort cellulaire à la mitochondrie. Le relâchement de cytochrome c induit par l'interaction de Bax- α ou Bak avec la protéine VDAC est accompagné d'une perte du potentiel transmembranaire de la mitochondrie. En revanche, les protéines Bid et Bik induisent la libération de cytochrome c par un mécanisme alternatif indépendant de l'ouverture des mégacanaux mitochondriaux (Shimizu and Tsujimoto, 2000). La protéine pro-apoptotique Bax- α possède la capacité de former des canaux ioniques dans des membranes artificielles (Schlesinger et al., 1997). De plus, certains travaux montrent que l'addition de la protéine recombinante Bax- α sur des mitochondries purifiées entraîne la libération de cytochrome c indépendamment de l'activité des mégacanaux mitochondriaux et sans induire une augmentation du volume mitochondrial. Ces résultats suggèrent l'hypothèse supplémentaire que la protéine pro-apoptotique Bax- α forme des canaux dans la membrane mitochondriale, directement perméables à cytochrome c (Martinou et al., 2000). La formation de ces canaux pourrait également causer une instabilité de la membrane externe de la mitochondrie en diminuant la tension linéaire de la bi-couche phospholipidique, ce qui favoriserait le relâchement du cytochrome c (Kroemer and Reed, 2000; Martinou et al., 2000).

LES RÉCEPTEURS DE MORT CELLULAIRE

La liaison de ligands spécifiques sur certains récepteurs exprimés à la surface cellulaire peut induire l'activation des caspases et la mort cellulaire

par apoptose. Ces récepteurs, appelés récepteurs de mort cellulaire, constituent une famille de protéines qui comprend CD95/Apo-1/ Fas, TNF-R1, DR3/Tramp/Wsl-1/Apo-3/Lard, DR4/Trail-R1/Apo-2, DR5/Trick2/Trail-R2 et DR6 (Ashkenazi and Dixit, 1999). Les récepteurs de mort cellulaire sont caractérisés par la présence d'un domaine DD (*death domain*) dans leur région cytoplasmique qui permet le recrutement de protéines qui possèdent des motifs homologues. Les mécanismes de transduction des signaux de mort cellulaire par les récepteurs stimulés font l'objet de recherches intensives. A l'heure actuelle, la cascade d'activation de l'apoptose induite par le récepteur CD95/Apo-1/Fas est la mieux caractérisée. L'activation du récepteur CD95/Apo-1/Fas induite par le ligand FasL, entraîne l'agrégation du récepteur à la surface de la membrane cellulaire et la formation d'un complexe multiprotéique intracellulaire appelé DISC, qui transmet le signal à l'intérieur de la cellule. Le DISC comprend la protéine adaptatrice Fadd/Mort-1 ainsi que la procaspase-8. La protéine adaptatrice Fadd/Mort-1 est recrutée au niveau du récepteur par des interactions impliquant les domaines DD homologues présents sur les deux protéines. La protéine Fadd/Mort-1 possède un domaine DED (*death effector domain*) à son extrémité N-terminale et recrute à son tour la procaspase-8 par des interactions homologues DED-DED. Des études récentes ont montré que l'oligomérisation de plusieurs molécules de procaspases-8 au niveau de la protéine adaptatrice induit l'activation de la procaspase-8 par autocatalyse (Muzio et al., 1998). L'activation de la caspase-8 au niveau du DISC initie la cascade d'activation des caspases responsables de l'exécution du programme de mort cellulaire. Récemment, deux types cellulaires ont été définis, concernant l'activation de l'apoptose induite par le récepteur CD95/Apo-1/Fas. Dans les cellules de type I, la quantité de caspase-8 activée au niveau du récepteur est suffisante pour promouvoir directement l'activation des caspases effectrices en aval (caspase-3, -7 et -6) et générer les changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose. Par contre, dans les cellules de type II, la caspase-8 activée au niveau du DISC engage la voie mitochondrial d'activation de l'apoptose qui amplifie le signal de mort cellulaire initié au niveau du récepteur (Figure 3). Dans les cellules de type II, l'apoptose induite par l'engagement du récepteur CD95/Apo-1/Fas est inhibée par la surexpression des protéines Bcl-xL ou Bcl-2 et l'activité anti apoptotique que celles-ci exercent au niveau de la

mitochondrie (Scaffidi et al., 1998). Plusieurs études suggèrent que le signal de mort cellulaire initié au niveau du récepteur CD95/Apo-1/Fas est transmis aux mitochondries par les protéines de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl. Deux groupes indépendants ont montré que la protéine Bid, qui possède un domaine BH-3 unique, est un substrat de la caspase-8 dans l'apoptose induite par le récepteur CD95/Apo-1/Fas. Le clivage de Bid par la caspase-8 au niveau du DISC entraîne la translocation du fragment C-terminal de la protéine (tBid) vers la mitochondrie où tBid induit la libération de cytochrome c (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Une autre étude suggère un modèle d'amplification de la cascade apoptotique initiée par le récepteur CD95/Apo-1/Fas qui implique la protéine Bax- α . Dans ce modèle, l'activation du récepteur entraîne la redistribution de la protéine Bax- α du cytosol vers les mitochondries où Bax- α induit la libération de cytochrome c (Murphy et al., 1999). Une relocalisation des protéines pro-apoptotiques Bax- α , Bad et Bcl-xS au niveau des mitochondries a également été observée dans les cellules leucémiques CEM traitées avec TNF- α (Jia et al., 1999).

L'ACTIVATION DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LA CHIMIOTHÉRAPIE

Les recherches intensives menées au cours de ces dernières années ont permis de définir davantage la fonction et le mode d'action des protéines de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl et des Ced-3/Ice/Caspases dans les mécanismes d'activation et de régulation de l'apoptose dans les cellules de mammifères et de nombreuses études ont révélé le rôle déterminant des protéines de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl dans la mort cellulaire induite par les agents cytotoxiques utilisés dans les thérapies anticancéreuses. Des dérégulations de l'expression des gènes de la famille des *ced-9/ egl-1/bcl* modifient la réponse et la sensibilité des cellules tumorales aux traitements anticancéreux. La chimiosensibilité des cellules tumorales en culture est augmentée par la surexpression de protéines pro-apoptotiques telles que Bax- α , Bik, Bak, alors que les cellules qui surexpriment les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 ou Bfl-1 présentent une résistance accrue à l'apoptose induite par différentes drogues anticancéreuses (Reed, 1995; Schmitt et al., 1999). Des études d'expression des protéines Bax- α et Bcl-xL dans des tumeurs humaines suggèrent également que ces protéines régulatrices de l'apoptose modulent la sensibilité des cellules tumorales *in vivo* aux traitements anticancéreux (Bargou et al., 1995; Krajewski et al., 1995; Olopade et al., 1997)

Les mécanismes d'activation de l'apoptose par les agents anticancéreux sont encore peu connus et font actuellement l'objet de recherches intenses. Plusieurs études suggèrent cependant que les signaux de mort cellulaire qui émergent des lésions cytotoxiques générées par les drogues convergent vers les mitochondries qui jouent un rôle central dans la phase d'initiation de l'apoptose.

- Les agents anticancéreux tels que les inhibiteurs de topoisomérase I et II (CPT et VP-16), la doxorubicine, ou les antimétabolites 1- β -D-arabino-furanosylcytosine (cytarabine) et 2-chloroadenosine induisent une perte du gradient électrochimique de la mitochondrie ($\Delta\Psi_m$) qui peut être inhibée par les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-xL (Decaudin et al., 1997; Kim et al., 1997).

- La translocation de cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme est observée dans plusieurs lignées cellulaires traitées avec des agents anticancéreux et l'inhibition de la libération de cytochrome c par les protéines Bcl-2 ou Bcl-xL bloque l'apoptose induite par les drogues (Kim et al., 1997; Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997).

- La surexpression des protéines Apaf-1 ou caspase-9 sensibilisent les cellules à l'apoptose induite par le taxol et l'étoposide alors que les cellules déficientes du gène *apaf-1* ou *caspase-9* sont résistantes à l'apoptose induite par des dommages à l'ADN (Hakem et al., 1998; Kuida et al., 1998; Yoshida et al., 1998).

Certains travaux suggèrent également que l'activation du récepteur de mort cellulaire CD95/Apo-1/Fas contribue à l'apoptose induite par les agents anticancéreux. En effet, dans certains modèles cellulaires, les drogues anticancéreuses telles que l'étoposide, le cisplatine, la doxorubicine ou la bléomycine, induisent une augmentation de l'expression du récepteur CD95/Apo-1/Fas et/ou de son ligand. Dans ces modèles, l'inhibition de la voie de signalisation du récepteur par des anticorps antagonistes, inhibe partiellement l'apoptose induite par les drogues (Friesen et al., 1999). D'autre part, dans certains systèmes, les drogues semblent induire l'agrégation et l'activation du récepteur CD95/Apo-1/Fas, indépendamment de la liaison ligand-récepteur. La contribution du récepteur CD95/Apo-1/Fas dans l'apoptose induite par les drogues est cependant controversée par de nombreuses études qui démontrent également que l'inhibition de la voie de signalisation du récepteur ne modifie pas la chimiosensibilité des cellules (Eischen et al., 1997;

McGahon et al., 1998). Plus récemment, certaines études ont démontré une augmentation de l'expression de DR5/Trail-R2 suite à des dommages à l'ADN suggérant la participation de récepteurs autres que CD95/Apo-1/Fas dans l'apoptose induite par les drogues (Wu et al., 1999). La contribution des récepteurs de mort cellulaire à l'apoptose induite par les agents anticancéreux reste à être définie. Cependant, l'augmentation de l'expression des récepteurs et/ou des ligand à la surface des cellules ainsi que l'augmentation du taux de ligand sécrété par les cellules suite à un dommage à l'ADN pourrait contribuer à amplifier le signal de mort cellulaire induit par les agents anticancéreux en suscitant l'activation des récepteurs de façon autocrine ou paracrine dans la population de cellules traitées.

CONCLUSION

Ces dernières années ont connu une véritable explosion des connaissances sur les mécanismes d'activation et de régulation de la mort cellulaire programmée. Les gènes de la famille des *ced-9/egl-1/bcl* codent des protéines régulatrices de la phase d'engagement de l'apoptose et influencent la décision d'une cellule si oui ou non elle va mourir suite à un stimulus de mort cellulaire. Le point de contrôle qu'assurent les protéines de la famille des Ced-9/Egl-1/ Bcl en amont des altérations mitochondriales qui initient l'activation des caspases et la phase d'exécution de l'apoptose en fait des cibles d'intérêt pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'inhibition des Ced/Bcl/Egl-1 anti-apoptotiques spécifiquement dans les cellules tumorales par l'utilisation d'antisens ou par des inhibiteurs synthétiques, ou inversement, l'activation des homologues pro-apoptotiques, devrait améliorer l'efficacité des agents cytotoxiques dans le traitement des cancers.

REMERCIEMENTS

RB est chercheur-boursier du Fond de la recherche en santé du Québec et supporté par des subventions du Conseil de la recherche médicale du Canada, de l'Institut national canadien de la recherche sur le cancer et de la Société de la recherche sur le cancer.

REFERENCES

- Alnemri, E. S. (1997). Mammalian cell death proteases - a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* *64*, 33-42.
- dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood* *90*, 935-943.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* *11*, 255-260.
- Bargou, R. C., Daniel, P. T., Mapara, M. Y., Bommert, K., Wagener, C., Kallinich, B., Royer, H. D., and Dorken, B. (1995). Expression of the *bcl-2* gene family in normal and malignant breast tissue: low *bax*-alpha expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. *Int J Cancer* *60*, 854-859.
- Bertin, J., Nir, W. J., Fischer, C. M., Tayber, O. V., Errada, P. R., Grant, J. R., Keilty, J. J., Gosselin, M. L., Robison, K. E., Wong, G. H. W., Glucksmann, M. A., and DiStefano, P. S. (1999). Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappa B. *J Biol Chem* *274*, 12955-12958.
- Boyd, J., Malstrom, S., Subramanian, T., Venkatesh, L., Schaeper, U., Elangovan, B., and Chinnadurai, G. (1994). E1B 19 KDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular protein. *Cell* *79*, 341-351.
- Brenner, C., Cadiou, H., Vieira, H. L., Zamzami, N., Marzo, I., Xie, Z., Leber, B., Andrews, D., Duclohier, H., Reed, J. C., and Kroemer, G. (2000). Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* *19*, 329-336.
- Cecconi, F., Alvarezbolado, G., Meyer, B. I., Roth, K. A., and Gruss, P. (1998). Apaf1 (Ced-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* *94*, 727-737.
- Chen, G., Cizeau, J., Velde, C. V., Park, J. H., Bozek, G., Bolton, J., Shi, L., Dubik, D., and Greenberg, A. (1999). Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem* *274*, 7-10.
- Chinnaiyan, A. M., Orourke, K., Lane, B. R., and Dixit, V. M. (1997). Interaction of Ced-4 with Ced-3 and Ced-9 - a molecular framework for cell death. *Science* *275*, 1122-1126.
- Decaudin, D., Geley, S., Hirsch, T., Castedo, M., Marchetti, P., Macho, A., Kofler, R., and Kroemer, G. (1997). Bcl-2 and Bcl-X(L) antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* *57*, 62-67.
- Eischen, C. M., Kottke, T. J., Martins, L. M., Basi, G. S., Tung, J. S., Earnshaw, W. C., Leibson, P. J., and Kaufmann, S. H. (1997). Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells - Chemotherapy-induced apoptosis is not
- Franke, T. F., and Cantley, L. C. (1997). Apoptosis - a Bad kinase makes good. *Nature* *390*, 116- 117.

- Friesen, C., Fulda, S., and Debatin, K. M. (1999). Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. *Leukemia* 13, 1854-1858.
- Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I., and Green, D. R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2, 156-162.
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C., and Korsmeyer, S. J. (1998). Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 17, 3878-3885.
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G. S., Henderson, J. T., Woo, M., Soengas, M. S., Elia, A., Delapompa, J. L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S. A., Lowe, S. W., Penninger, J. M., and Mak, T. W. (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94, 339-352.
- Hausmann, G., O'Reilly, L. A., van Driel, R., Beaumont, J. G., Strasser, A., Adams, J. M., and Huang, D. C. (2000). Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L). *J Cell Biol*.
- Hickman, J. A. (1996). Apoptosis and chemotherapy resistance. *Eur J Cancer* 32A, 921-926.
- Hsu, Y. T., Wolter, K. G., and Youle, R. J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X-L during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 94, 3668-3672.
- Hu, Y. M., Benedict, M. A., Wu, D. Y., Inohara, N., and Nunez, G. (1998). Bcl-X-L interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 95, 4386-4391.
- Imai, Y., Kimura, T., Murakami, A., Yajima, N., Sakamaki, K., and Yonehara, S. (1999). The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* 398, 777-785.
- Inohara, N., Gourley, T. S., Carrio, R., Muniz, M., Merino, J., Garcia, L., Koseki, T., Hu, Y. M., Chen, S., and Nunez, G. (1998). Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *J Biol Chem* 273, 32479-32486.
- Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J., and G, N. (1999). Nod-1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 274, 14560-14567.
- activation in apoptosis. *Trends Biochem Sci* 24, 1-4.
- Jia, L., Macey, M. G., Yin, Y. Z., Newland, A. C., and Kelsey, S. M. (1999). Subcellular distribution and redistribution of Bcl-2 family proteins in human leukemia cells undergoing apoptosis. *Blood* 93, 2353-2359.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kim, C. N., Wang, X. D., Huang, Y., Ibrado, A. M., Liu, L., Fang, G. F., and Bhalla, K. (1997). Overexpression of Bcl-X(L), inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res* 57, 3115-3120.
- Kluck, R. M., Bossywetzel, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (1997). The release of cytochrome C from mitochondria - a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.
- Krajewski, S., Blomqvist, C., Franssila, K., Krajewska, M., Wasenius, V. M., Niskanen, E., Nordling, S., and Reed, J. C. (1995). Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res* 55, 4471-4478.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W., and Reed, J. C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53, 4701-4714.
- Kroemer, G., and Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-519.
- Kroemer, G., Zamzami, N., and Susin, S. A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18, 44-51.
- Kuida, K., Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M. S. S., Rakic, P., and Flavell, R. A. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, 325-337.
- Kumar, S. (1999). Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Diff* 6, 1060-1066.
- Kumar, S., and Colussi, P. A. (1999). Prodomains-adaptors-oligomerization: the pursuit of caspase
- Li, H. L., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. Y. (1998). Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the

- mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. D. (1998). Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- Martin, S. J., and Green, D. R. (1995). Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Critical Rev Oncol Hematol* 18, 137-153.
- Martinou, J. C., Desagher, S., and Antonsson, B. (2000). Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol* 2, E41-E43.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L. A., Prevost, M. C., Xie, Z. H., Matsuyama, S., Reed, J. C., and Kroemer, G. (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281, 2027-2031.
- Matsushima, M., Fujiwara, T., Takahashi, E., Minaguchi, T., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Suzumori, K., and Nakamura, Y. (1998). Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (Bnip3) encoding a protein homologous to human Nip3. *Genes Chromo Cancer* 21, 230-235.
- McGahon, A. J., Pereira, A. P. C., Daly, L., and Cotter, T. G. (1998). Chemotherapeutic drug-induced apoptosis in human leukaemic cells is independent of the Fas (Apo-1/Cd95) receptor/ligand system. *Br J Haematol* 101, 539-547.
- Metzstein, M. M., Stanfield, G. M., and Horvitz, H. R. (1998). Genetics of programmed cell death in *C. Elegans* - past, present and future. *Trends Genet* 14, 410-416.
- Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. C., and Fesik, S. W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-341.
- Murphy, K. M., Streips, U. N., and Lock, R. B. (1999). Bax membrane insertion during Fas(CD95)-induced apoptosis precedes cytochrome c release and is inhibited by Bcl-2. *Oncogene* 18, 5991-5999.
- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273, 2926-2930.
- Nechushtan, A., Smith, C. L., Hsu, Y. T., and Youle, R. J. (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J* 18, 2330-2341.
- Ng, F. W. H., Nguyen, M., Kwan, T., Branton, P. E., Nicholson, D. W., Cromlish, J. A., and Shore, G. C. (1997). P28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 139, 327-338.
- Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-1042.
- Nomura, M., Shimizu, S., Ito, T., Narita, M., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1999). Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2. *Cancer Res* 59, 5542-5548.
- O'Reilly, L. A., and Strasser, A. (1999). Apoptosis and autoimmune disease. *Inflam Res* 48, 5-21.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.
- Olopade, O. I., Adeyanju, M. O., Safa, A. R., Hagos, F., Mick, R., Thompson, C. B., and Recant, W. M. (1997). Overexpression of Bcl-X protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J Sci Am* 3, 230-237.
- Pan, G. H., Orourke, K., and Dixit, V. M. (1998). Caspase-9, Bcl-X-L, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 273, 5841-5845.
- Perkins, C., Kim, C. N., Fang, G. F., and Bhalla, K. N. (1998). Overexpression of Apaf-1 promotes apoptosis of untreated and paclitaxel- or etoposide-treated HI-60 cells. *Cancer Res* 58, 4561-4566.
- Rebollo, A., D, P. r.-S., and Mart#nez, A. C. (1999). Bcl-2 differentially targets K-, N-, and H-Ras to

- mitochondria in IL-2 supplemented or deprived cells: Implications in prevention of apoptosis. *Oncogene* 18, 4930-4939.
- Reed, J. C. (1997). Bcl-2 family proteins - Regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 34, 9-19.
- Reed, J. C. (1995). Bcl-2 family proteins - Regulators of chemoresistance in cancer. *Toxicol Lett* 3, 155-158.
- Reed, J. C. (1995). Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol -Oncol Clin North Am* 9, 451-473.
- Reed, J. C. (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 17, 2941.
- Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., and Borner, C. (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome C. *Nature* 391, 496-499.
- Savill, J. (1998). Apoptosis - Phagocytic Docking Without Shocking. *Nature* 392, 442-443.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two Cd95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17, 1675-1687.
- Schendel, S. L., Montal, M., and Reed, J. C. (1998). Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ* 5, 372-380.
- Schlesinger, P. H., Gross, A., Yin, X. M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G., and Korsmeyer, S. J. (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic Bax and antiapoptotic Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 94, 11357-11362.
- Schmitt, C. A., and Lowe, S. W. (1999). Apoptosis and therapy. *J Pathol* 187, 127-37.
- Schmitt, E., Sane, A. T., and Bertrand, R. (1999). Activation and role of caspases in chemotherapy-induced apoptosis. *Drug Resist Updates* 2, 21-29.
- Schmitt, E., Sane, A. T., Steyeart, A., Cimoli, G., and Bertrand, R. (1997). The Bcl-xL and Bax control points; Modulation of cancer chemotherapy-induced apoptosis and relation to TPCK-sensitive protease and caspase activation. *Biochem Cell Biol* 75, 301-314.
- Sedlak, T. W., Oltvai, Z. N., Yang, E., Wang, K., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (1995). Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 92, 7834-8.
- Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T., and Tsujimoto, Y. (2000). BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci (U S A)* 97, 3100-5.
- Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483-487.
- Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (2000). Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci (U S A)* 97, 577-582.
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R., and Martin, S. J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144, 281-292.
- Song, Q. Z., Kuang, Y. P., Dixit, V. M., and Vincenz, C. (1999). Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J* 18, 167-178.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1, 949-957.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P. M., and Kroemer, G. (1999). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 189, 381-393.
- Susin, S. A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis -doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1366, 151-165.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267,1456-62.
- Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T., and Thompson, C. B. (1997). Bcl-X(L) regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91, 627-637.
- Vander Heiden, M. G., and Thompson, C. B. (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol* 1, E209-E216.
- Voehringer, D. W., McConkey, D. J., McDonnell, T. J., Brisbay, S., and Meyn, R. E. (1998). Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to

- the nucleus. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 95, 2956-2960.
- Wang, H. G., Rapp, U. R., and Reed, J. C. (1996). Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 87, 629-638.
- Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., 3rd, Meng, R. D., Kao, G., Muschel, R., Yen, T., and el-Deiry, W. S. (1999). Induction of the TRAIL receptor KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 18, 6411-6418.
- Wyllie, A. H. (1987). Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol* 153, 313-316.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Yang, E., and Korsmeyer, S. J. (1996). Molecular thanatopsis: A discourse on the bcl2 family and cell death. *Blood* 88, 386-401.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285-291.
- Yang, J., Liu, X. S., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J. Y., Peng, T. I., Jones, D. P., and Wang, X. D. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2 : Release of cytochrome C from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.
- Yasuda, M., Han, J. W., Dionne, C. A., Boyd, J. M., and Chinnadurai, G. (1999). BNIP3 alpha: A human homolog of mitochondrial proapoptotic protein BNIP3. *Cancer Res* 59, 533-537.
- Yoshida, H., Kong, Y. Y., Yoshida, R., Elia, A. J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J. M., and Mak, T. W. (1998). Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 94, 739-750.
- Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., and Kroemer, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 183, 1533-1544.
- Zhu, L., Ling, S., Yu, X. D., Venkatesh, L. K., Subramanian, T., Chinnadurai, G., and Kuo, T. H. (1999). Modulation of mitochondrial Ca²⁺ homeostasis by Bcl-2. *J Biol Chem* 274, 33267-33273.
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X. S., Lutschg, A., and Wang, X. D. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. Elegans* Ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.

C. elegans

H. Sapiens

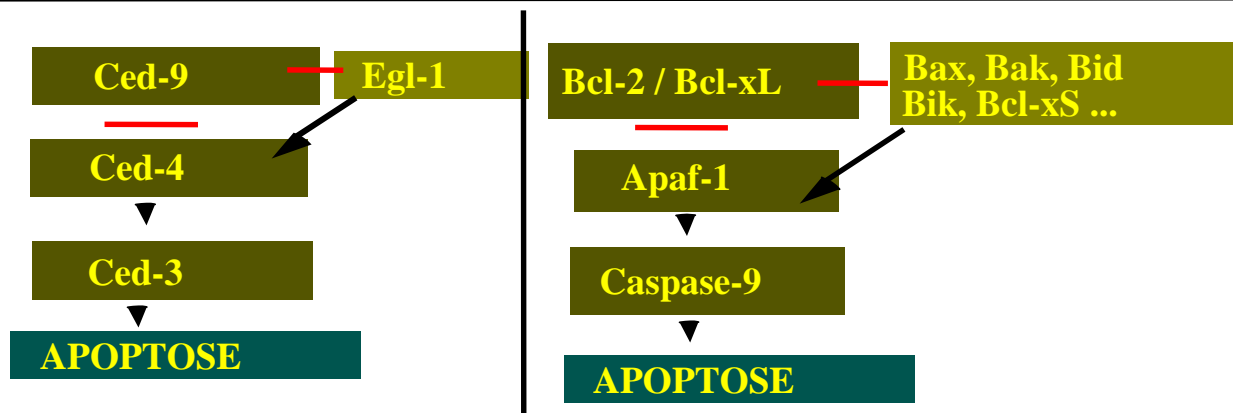


Figure 1: Les mécanismes d'activation de l'apoptose au cours de l'évolution

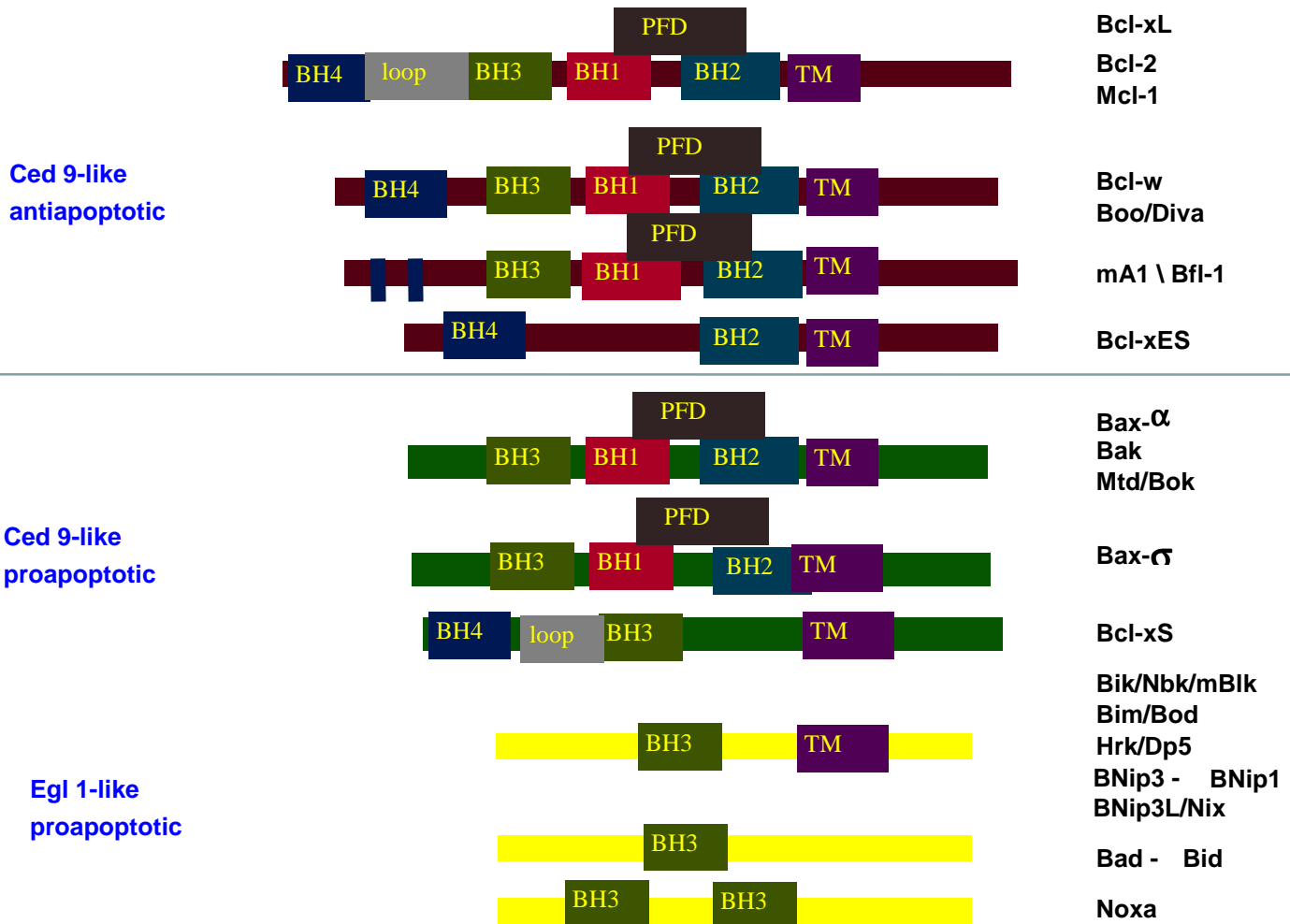


Figure 2: Les protéines de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl

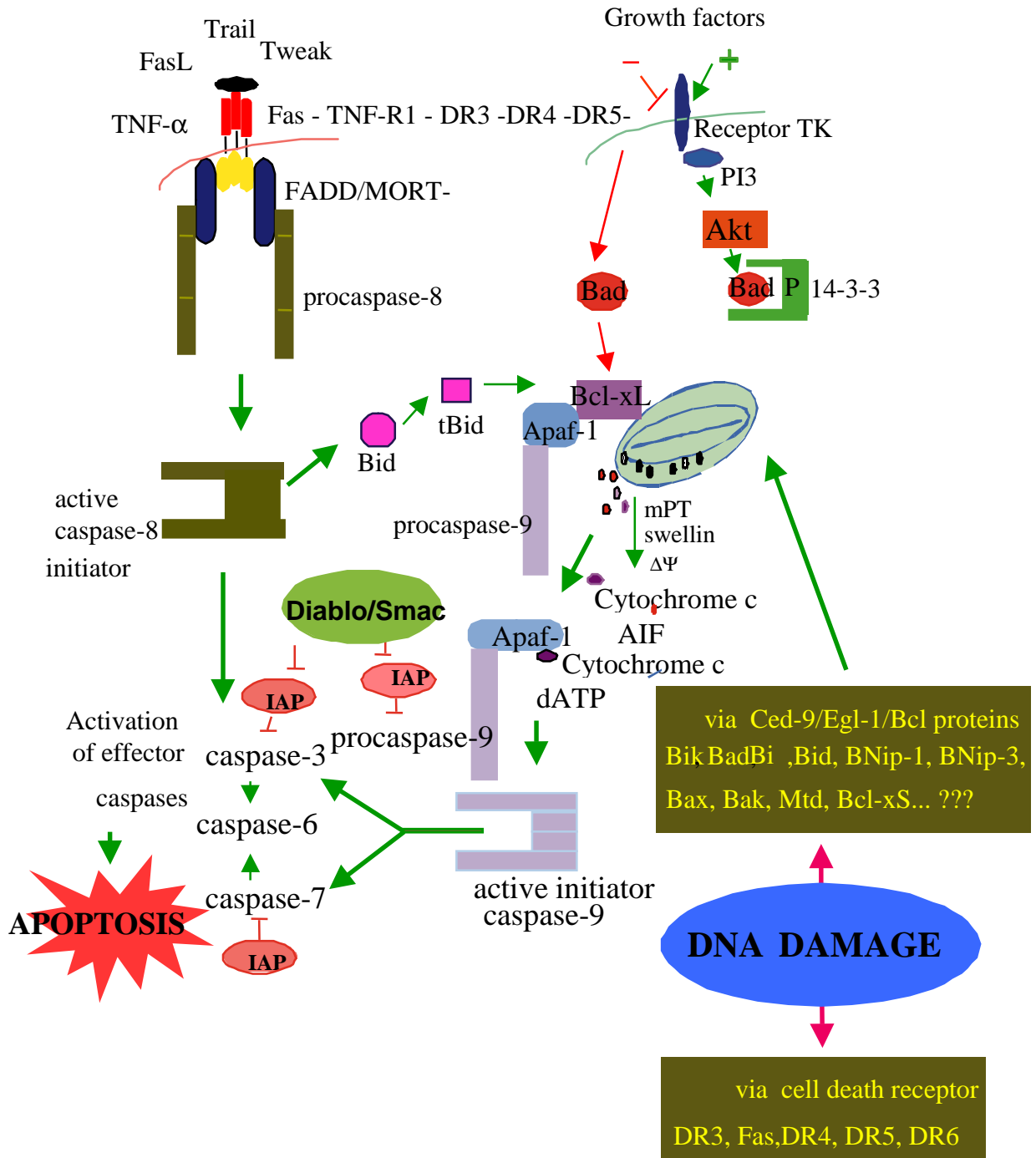


Figure 3: Les voies d'activation de l'apoptose