

# Mort des motoneurones, Bcl-2 et caspases : des cibles thérapeutiques en cascade

*To die or not to die? That is the question* pour un motoneurone au cours du développement ou en situation de dégénérescence. La réponse peut dépendre de la régulation des mécanismes apoptotiques – de leur activation ou de leur inhibition.

L'apoptose est un processus actif de mort cellulaire caractérisée par une résorption cytoplasmique (*cytoplasmic shrinkage*), des protubérances membranaires (*membrane blebbing*), une condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN nucléaire. Selon un modèle moléculaire très schématique (*figure 1*), cette mort cellulaire se déroule en cascade avec une phase d'activation, une phase de propagation et une phase d'exécution [1, 2], faisant intervenir une multitude de facteurs parmi lesquels les radicaux libres, les facteurs neurotrophiques, les protéines de la famille Bcl-2 – pro- ou anti-apoptotiques, des protéines mitochondriales (cytochrome c, AIF), les APAF et les caspases (protéases à cystéine).

L'apoptose est un processus essentiel du développement du système nerveux servant à ajuster le nombre des populations neuronales. Pendant la période embryonnaire les motoneurones sont initialement engendrés en excès [3], et sont ensuite en partie éliminés. Ainsi, les motoneurones dont les axones n'ont pas établi les connexions synaptiques correctes avec leurs cibles d'innervation (les muscles squelettiques), meurent.

L'inhibition expérimentale de certaines caspases, soit par des inhibiteurs peptidiques (YVAD) de la caspase-1 [4], soit par invalidation de leurs gènes comme cela a été démontré pour le gène de la caspase-3 (CPP32), peut aboutir à une apop-

tose neuronale réduite et des sous-populations neuronales en sur-nombre [5]. En revanche, dans les affections dégénératives des motoneurones, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et les amyotrophies spinales infantiles (ASI), on suspecte depuis plusieurs années une suractivation de l'apoptose.

En effet, certaines amyotrophies spinales infantiles sont associées à des délétions du gène *NAIP* (*neuronal apoptosis inhibitory protein*) [6]. Ce gène code pour une protéine analogue d'une protéine anti-apoptotique de baculovirus, et est situé à proximité immédiate du gène *SMN* dont l'altération est la cause de la maladie. En outre, l'expression normale de *NAIP* semble plus élevée dans les neurones qui vont dégénérer dans les ASI [7]. Chez des patients décédés de SLA, Yoshiyama *et al.* (Yokohama, Japon) [8] et

Troost *et al.* (Amsterdam, Pays-Bas) [9] ont retrouvé des signes de fragmentation de l'ADN dans la moelle épinière. Finalement, Sendtner *et al.* (Würzburg, Allemagne) viennent de décrire la présence de tels signes dans les motoneurones de la souris *pnn*, un modèle génétique de dégénérescence motoneuronale progressive (*m/s n° 7, vol. 8, p. 744*) [10]. Comme la dégénérescence motoneuronale s'étend sur une longue période, seule une petite fraction des motoneurones montrent ces stigmates de l'apoptose à un moment donné lorsque, probablement, d'autres motoneurones sont, soit déjà éliminés, soit encore épargnés par le processus dégénératif.

Des approches plus indirectes ont étayé davantage le rôle des processus apoptotiques et anti-apoptotiques dans les dégénérescences motoneuronales et ouvrent également des pers-

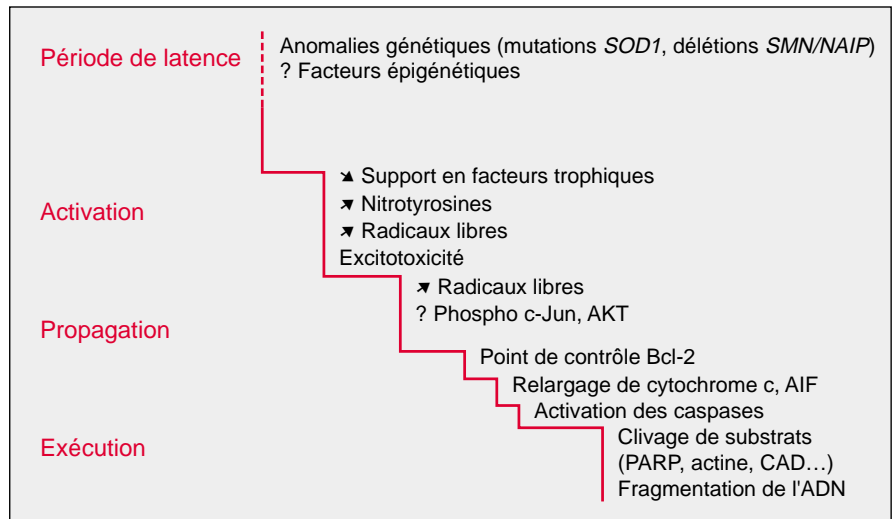


Figure 1. *L'apoptose des motoneurones au cours de dégénérescences progressives est représentée comme une cascade d'événements (schéma modifié de [1]).*

pectives nouvelles pour leur futur traitement (Tableau I). Dubois-Dauphin *et al.* (Genève, Suisse) [11] ont montré que des souris transgéniques surexprimant la protéine Bcl-2 dans les cellules neuronales étaient protégées de la dégénérescence motoneuronale aiguë induite par section d'un nerf périphérique. Par la suite, ces souris transgéniques exprimant Bcl-2 ont été croisées avec différents mutants de dégénérescence motoneuronale progressive, les souris *pmn*, *wobbler* (*m/s n°12, vol. 10, p. 1324*) ou des souris transgéniques pour une mutation de la superoxyde dismutase 1 (*SOD1 G93A*). Comparées aux souris transgéniques *SOD1 G93A* (*m/s n°10, vol. 4, p. 650*), les souris doublement transgéniques *Bcl-2/G93A* ont une apparition retardée des signes cliniques et une survie significativement prolongée [12]. La protéine Bcl-2 réduit la perte des motoneurons de la moelle épinière et de leurs axones dans le nerf phrénique, et préserve les terminaisons nerveuses dans le muscle. En revanche, le processus de réinnervation musculaire par repousse de collatérales terminales (*sprouting*), déjà important chez la souris *SOD1 G93A*, n'est pas modifié. Une autre stratégie a été de surexpri-

mer un inhibiteur dominant négatif de la caspase-1/ICE [13]. Bien que chez les animaux doublement transgéniques *SOD1 G93R/inhibiteur caspase-1* l'apparition des premiers signes cliniques n'ait pas été retardée, leur survie a été prolongée de 20 jours en moyenne. Dans le modèle de la souris *pmn* (*progressive motor neuronopathy*) [14], la surexpression de Bcl-2 protège contre la perte des motoneurons au niveau des corps cellulaires mais non au niveau axonal et reste sans effet sur la survie des animaux [15]. Finalement, chez les souris doublement transgéniques *wobbler/Bcl-2* une réduction de la mort au cours du développement et après axotomie a été notée mais aucune protection contre la dégénérescence liée au contexte génétique n'a été observée [16]. L'ensemble de ces résultats pourraient refléter différents phénomènes: (1) il existerait différents mécanismes de mort motoneuronale, modulables ou non par Bcl-2 et les caspases; (2) les niveaux de protection requis contre l'apoptose seraient eux-mêmes différents; (3) la susceptibilité de sous-populations motoneuronales à l'apoptose pourrait être variable; et, (4) des mécanismes pathologiques impliquant d'autres

types cellulaires, tels que les fibres musculaires, les cellules de Schwann ou les cellules gliales, pourraient intervenir dans l'apoptose motoneuronale. Certaines dégénérescences motoneuronales pourraient donc être des cibles plus faciles que d'autres pour un traitement anti-apoptotique.

«*Not to die*», assurer la survie, n'est pas tout: un motoneurone doit fonctionner! De ce fait, une intervention anti-apoptotique pourrait agir en synergie avec d'autres approches comme, par exemple, la délivrance de facteurs neurotrophiques. Ainsi, l'expression de molécules anti-apoptotiques pourrait maintenir en vie les motoneurons ou leurs cibles d'innervation tandis que certains facteurs neurotrophiques [17, 18] contribueraient à restaurer un environnement trophique normal ou à rétablir les interactions cellulaires.

G.H.

1. Holtzman DM, Deshmukh M. Caspases: a treatment target for neurodegenerative disease? *Nat Med* 1997; 3: 954-5.
2. Mignon A, Rouquet N, Joulin V. Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose: un enjeu thérapeutique pour demain? *Med Sci* 1998; 14: 9-17.

Tableau I

PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES SOURIS MUTANTES AVANT ET APRÈS CROISEMENT AVEC DES SOURIS TRANSGÉNIQUES POUR DES GÈNES ANTI-APOPTOTIQUES

Souris	<i>SOD1 G93A</i>	<i>Bcl-2</i>	<i>SOD1 G93A/Bcl-2</i>	<i>SOD1 G93R</i>	<i>SOD1 G93R/casp inh</i>	<i>pmn</i>	<i>pmn/Bcl-2</i>
Début signes cliniques (jours)	170		203	238	243	16	16
survie moyenne (jours)	240		275	249	270	38	38
<b>Motoneurons</b>							
jour d'examen	239	239	239			38	38
corps cellulaires	38*	76*	57*	nd	nd	2217***	3153***
axones myélinisés**	99	213	146	nd	nd	± 100	± 100
protection contre axotomie		oui			nd		oui
<b>Plaques motrices</b>							
innervées	22 %	100 %	48 %	nd	nd	nd	nd
réinnervées	50 %	0 %	49 %	nd	nd	nd	nd
Référence	[12]			[13]		[15]	

\* Corne ventrale de la moelle épinière cervicale (C7).

\*\* Nerf phrénique.

\*\*\* Noyau du nerf facial.

3. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1991; 14: 453-501.

4. Milligan CE, Prevette D, Yaginuma H, Homma S, Cardwell C, *et al.* Peptide inhibitors of the ICE protease family arrest programmed cell death of motoneurons *in vivo* and *in vitro*. *Neuron* 1995; 15: 385-93.

5. Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, *et al.* Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 1996; 384: 368-72.

6. Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, *et al.* The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995; 80: 167-78.

7. Xu DG, Korneluk RG, Tamai K, Wigle N, Hakim A, *et al.* Distribution of neuronal apoptosis inhibitory protein-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1997; 382: 247-59.

8. Yoshiyama Y, Yamada T, Asanuma K, Asahi T. Apoptosis related antigen, Le(Y) and nick-end

labeling are positive in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 1994; 88: 207-11.

9. Troost D, Aten J, Morsink F, Dejong JMBV. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis is not restricted to motor neurons. Bcl-2 expression is increased in unaffected post-central gyrus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1995; 21: 498-504.

10. Sendtner M, Götz R, Holtmann B, Thoenen H. Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *J Neurosci* 1997; 17: 6999-7006.

11. Dubois-Dauphin M, Frankowski H, Tsujimoto Y, Huarte J, Martinou JC. Neonatal motoneurons overexpressing the bcl-2 protooncogene in transgenic mice are protected from axotomy-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3309-13.

12. Kostic V, Jackson-Lewis V, de Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S. Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 1997; 277: 559-62.

13. Friedlander RM, Brown RH, Gagliardini V, Wang J, Yuan J. Inhibition of ICE slows ALS in mice. *Nature* 1997; 388: 31.

14. Schmalbruch H, Jensen HS, Bjaerg M, Kamienska Z, Kurlan L. A new mouse mutant with progressive motor neuronopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1991; 50: 192-204.

15. Sagot Y, Dubois-Dauphin M, Tan SA, Deilbao F, Aebischer P, Martinou JC, *et al.* Bcl-2 overexpression prevents motoneuron cell body loss but not axonal degeneration in a mouse model of a neurodegenerative disease. *J Neurosci* 1995; 15: 7727-33.

16. Couplier M, Junier MP, Peschanski M, Dreyfus PA. Bcl-2 sensitivity differentiates two pathways for motoneuronal death in the wobbler mutant mouse. *J Neurosci* 1996; 16: 5897-904.

17. Haase G, Kennel P, Schmalbruch H. Dernière heure: efficacité de l'administration intramusculaire d'un adénovirus codant pour la neurotrophine-3 sur l'évolution d'une dégénérescence motoneuronale murine. *Med Sci* 1997; 13: 753-6.

18. Haase G, Kennel P, Pettmann B, Vigne E, Akli S, Revah F, *et al.* Gene therapy of a murine motor neuron disease using adenoviral vectors for neurotrophic factors. *Nat Med* 1997; 3: 429-36.

## ■■■ BRÈVES ■■■

■■■ **Synergie antalgique de l'aspirine et de la morphine.** L'association aspirine-opiacés permet d'obtenir des effets analgésiques plus importants que la simple addition des effets des deux substances administrées séparément. Cette intéressante synergie a été mise à profit pour diminuer les doses de chaque agent et éviter ainsi certains effets secondaires, mais son mécanisme restait inconnu. Un groupe australien vient lever aujourd'hui une partie du voile en montrant une synergie entre les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les agonistes de type  $\mu$  de la morphine pour inhiber la libération de GABA [1]. L'étude a porté sur les neurones de la substance grise périaqueducale, un des principaux relais des voies nociceptives. Il existe à ce niveau une libération spontanée de GABA, indépendante de l'arrivée de potentiels d'action, dont résultent des potentiels miniatures postsynaptiques qui peuvent être enregistrés sur des tranches de tissu. Ces potentiels sont fortement réduits par une superfusion de met-enképhaline, et la pharmacologie démontre que cette inhibition résulte de l'action de récepteurs de type  $\mu$ . Les auteurs

démontrent ensuite que ces récepteurs sont présynaptiques, et agissent donc en inhibant la libération de GABA. Ce phénomène met en jeu une conductance potassium dépendante du potentiel. Les récepteurs  $\mu$  sont couplés à des protéines G, inhibant la production d'AMPc et stimulant l'activité de la phospholipase C, mais le blocage de ces deux voies ne modifie pas l'action des morphiniques [2]. Les récepteurs  $\mu$  pourraient aussi stimuler l'activité de la phospholipase A2, et des inhibiteurs de la production d'acide arachidonique inhibent effectivement la libération de GABA sur les tranches. Rappelons que l'acide arachidonique est à l'origine de trois voies métaboliques: (1) la production de prostaglandines par l'action des cyclo-oxygénases (*m/s n° 4, vol. 10, p. 468*); (2) la production des hépoxilines par l'action de la 12-lipoxygénase; (3) la production des leukotriènes *via* la 5-lipoxygénase. Par différentes combinaisons d'inhibiteurs sélectifs, les auteurs montrent qu'en bloquant la production de prostaglandines, par exemple avec l'aspirine ou l'indométhacine, et en inhibant la voie de la 5-lipoxygénase, par exemple avec

de la caféine, ils peuvent orienter le métabolisme de l'acide arachidonique vers la voie de la 12-lipoxygénase et démontrent que les hépoxilines sont responsables de l'inhibition de la libération de GABA. En administration intrathécale, il avait déjà été montré chez l'animal éveillé une synergie des effets antalgiques entre les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les agonistes morphiniques de type  $\mu$  ou noradrénergiques de type  $\alpha 2$ , tandis qu'il n'existait pas d'interaction avec les agonistes opiacés  $\kappa$  et purinergiques A1 [3]. Il reste donc à savoir si le mécanisme mis en évidence au niveau de la substance grise périaqueducale existe au niveau des cornes dorsales de la moelle épinière, ce qui ouvrirait d'importantes perspectives pour limiter les effets secondaires souvent majeurs des anesthésies péridurales.

[1. Vaughan CW, *et al.* *Nature* 1997; 390: 611-4.]

[2. Kieffer B, *et al.* *Med Sci* 1997; 13: 232-5.]

[3. Malmberg AB, *et al.* *Anesthesiology* 1993; 79: 211-3.]