

AIF: un nouvel agent double mitochondrial

La mitochondrie joue un rôle clé dans la régulation de l'apoptose [1-3]. En effet, la phase effectrice de l'apoptose comporte l'ouverture des pores de transition de perméabilité des mitochondries et la libération de molécules apoptogènes. Cette phase est sous le contrôle de l'agent anti-apoptotique Bcl-2 (figure 1). Parmi les molécules apoptogènes libérées de la mitochondrie (cytochrome c, caspases-2, 3 et 9, AIF), le facteur AIF (*apoptosis inducing factor*) est capable, à lui seul, d'induire l'apoptose de noyaux isolés mais est dépourvu de toute activité caspase de type Z-VADase. Nous avons caractérisé la structure de ce facteur et précisé sa fonction [4].

La molécule AIF (figure 2) a été purifiée à partir d'un surnageant de mitochondrie de foie de souris après induction de la transition de perméabilité (*m/s* 1997, n°5, p. 738). Les ADNc humains et murins de AIF ont été clonés et la recherche de séquences d'homologie montre que la séquence de l'AIF est fortement conservée entre l'humain et la souris: 92 % des acides aminés sont identiques. Il existe, en outre une forte homologie dans la partie carboxy-terminale (acides aminés 128 à 613 de AIFm) avec de nombreuses oxydoréductases à NADH d'eubactéries et d'archaebactéries. La partie aminotermine correspond à une séquence de ciblage mitochondrial. L'ADNc isolé n'hybride qu'avec un seul chromosome, le chromosome X, dans un locus synténique de la région Xq25-26 du chromosome X humain.

La protéine AIF mûre est libérée des mitochondries après l'induction de la transition de perméabilité par des agents tels que l'atractyloside, le calcium ou le *tert*-butylhydroperoxide. Ce relargage est inhibé par la ciclosporine A, un inhibiteur de la transition de perméabilité [3]. L'immunodéplétion de AIF du surnageant de mitochondries en transition de perméabilité abolit tout effet apoptotique sur

les noyaux isolés dans un système acellulaire, ce qui montre que AIF est le principal facteur mitochondrial responsable de l'apoptose nucléaire. Le fractionnement subcellulaire, l'analyse en immunofluorescence et l'immunodétection en microscopie électronique confirment que AIF est exclusivement présent dans l'espace intermembranaire mitochondrial des cellules intactes. Cependant, après induction de l'apoptose par la staurosporine et la dexaméthasone, AIF est transféré de la mitochondrie vers le cytosol et le noyau.

Cette redistribution est concomitante de la baisse du potentiel mitochondrial, suivie de la condensation chromatinienne à la périphérie du noyau. En effet, lorsque du facteur AIF recombinant est ajouté à des noyaux isolés de cellules Hela il provoque une condensation chromatinienne accompagnée d'une digestion de l'ADN en fragments de haut poids moléculaire (50 kb). Il est intéressant de noter toutefois que AIF n'est pas capable à lui seul de provoquer la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN, ce qui signifie que cette fragmentation

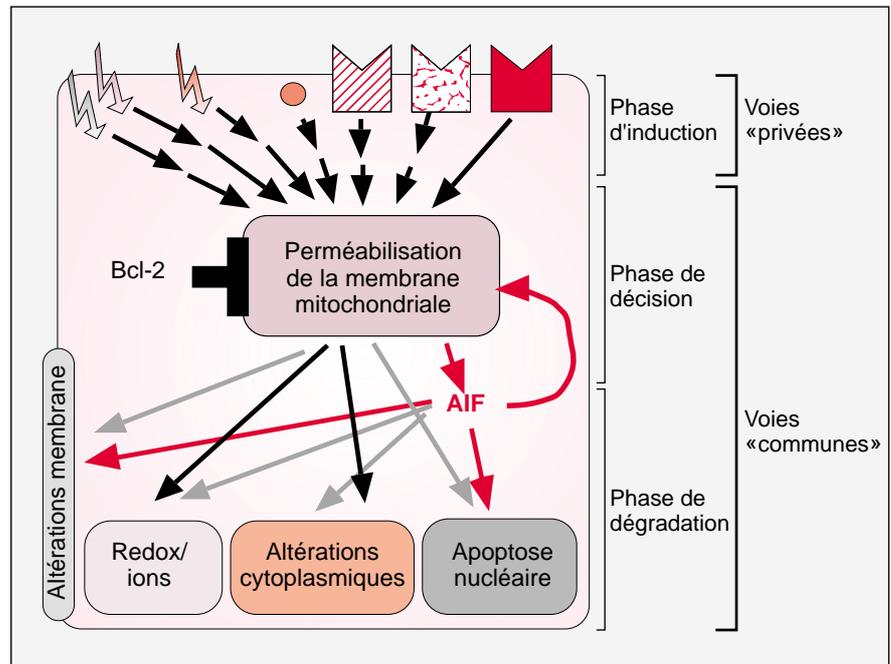


Figure 1. **Représentation schématique de l'apoptose.** Différentes voies de déclenchement de l'apoptose peuvent emprunter chacune une voie de transmission du signal apoptotique particulière (voies privées) dont l'aboutissant est la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Celle-ci est en grande partie sous le contrôle du facteur anti-apoptotique Bcl-2. Parmi les conséquences de l'ouverture des pores de transition de perméabilité, la libération dans le cytoplasme de facteurs pro-apoptotiques. Parmi ceux-ci (cytochrome c, caspases) le facteur AIF (apoptosis inducing factor) a un effet direct sur l'apoptose des noyaux isolés, induisant la condensation chromatinienne à la périphérie des noyaux, et sur la transition de perméabilité mitochondriale, activant ainsi une boucle d'auto-amplification. On observe, en outre, l'exposition de phosphatidylsérine à la face externe de la membrane plasmique.

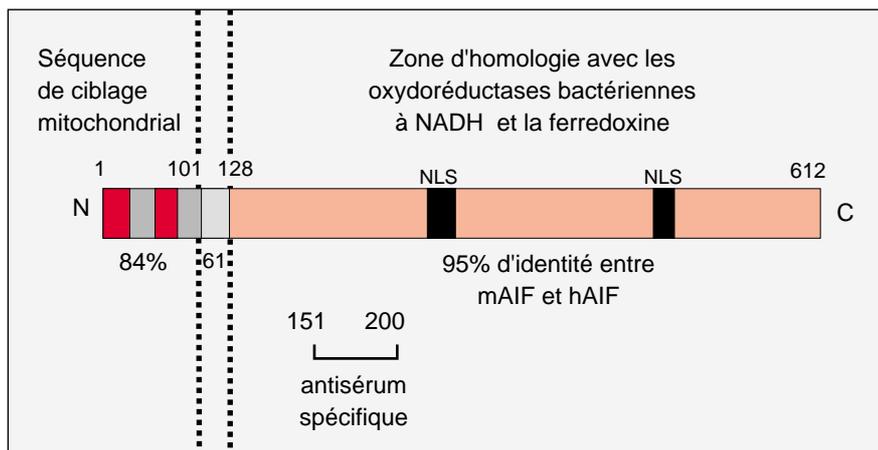


Figure 2. **Structure de la protéine AIF (apoptosis inducing factor).** Il s'agit d'une flavoprotéine de 612 acides aminés dont la séquence est très conservée entre la souris (mAIF) et l'homme (hAIF). La partie carboxy-terminale a de fortes homologies avec les oxydoréductases à NADH bactériennes et la ferredoxine, et comporte des signaux de localisation nucléaire (NLS). La partie amino-terminale correspond à un signal de localisation mitochondriale.

nécessite l'activation d'autres facteurs. À côté de ces effets nucléaires, AIF recombinant est également actif sur des mitochondries isolées. En présence de certains facteurs cytosoliques non encore déterminés, AIF provoque le gonflement mitochondrial, la perte du potentiel membranaire et la libération de protéines apoptogènes comme le cytochrome c et la caspase-9. Il faut souligner qu'aucun de ces effets n'est aboli par l'inhibiteur de caspases à large spectre Z-VAD-fmk, ce qui suggère que ces effets sont indépendants des caspases.

Une autre série d'expériences a permis de déterminer si la localisation extramitochondriale de AIF peut provoquer l'apoptose *in vivo*. Nous avons observé que la micro-injection de AIF recombinant dans des cellules intactes provoque au bout d'une heure environ tous les signes classiques de l'apoptose, à savoir : la condensation chromatinienne, la dissipation du potentiel mitochondrial et l'exposition des phosphatidylsérines à la face externe de la membrane plasmique. Alors qu'aucun de ces stigmates n'est bloqué par l'inhibiteur des caspases Z-VAD.fmk, la co-injection avec la protéine recombinante d'un anticorps spécifique anti-AIF permet de prévenir tous ces signes apoptotiques.

En résumé, ces travaux montrent que la protéine AIF est une protéine de l'espace intermembranaire mitochondrial. Tout comme le cytochrome c, il s'agit d'une molécule phylogénétiquement ancienne, avec une double fonction : oxydoréductase et facteur apoptogène. Afin que cette dernière activité s'exerce, il faut une redistribution subcellulaire de la protéine : de la mitochondrie vers le cytosol puis vers le noyau. Contrairement à la voie du cytochrome c, qui nécessite l'activation de la caspase-3 et qui culmine au niveau de la fragmentation oligonucléosomique, la voie AIF est indépendante des cas-

pases et ne nécessite aucun intermédiaire pour provoquer l'apoptose nucléaire. Elle constituerait ainsi le prototype des voies indépendantes des caspases ■

RÉFÉRENCES

1. Zamzami N, *et al.* Mitochondrial control of nuclear apoptosis *J Exp Med* 1996; 183: 1533-44.
2. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997; 3: 614-20.
3. Brenner C, Marzo I, Zamzami N, Susin S, Vieira H, Kroemer G. Coopération mortelle entre la protéine pro-apoptotique Bax et le translocateur à adénine nucléotide pour le contrôle mitochondrial de l'apoptose. *Med Sci* 1998; 14: 1399-401.
4. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-6.

Naoufal Zamzani

Docteur ès sciences, chargé de recherche au Cnrs.

Santos A. Susin

Docteur ès sciences, stagiaire post-doctoral.

Guido Kroemer

Docteur en médecine, docteur ès sciences, directeur de recherche au Cnrs.

Cnrs UPR420, 19, rue Guy-Moquet, BP8, 94801 Villejuif, France.

TIRÉS À PART

N. Zamzani.