



7. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 369-77.
8. Kudla G, Montessuit S, Eskes R, Berrier C, Martinou JC, Ghazi A, Antonsson B. The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment *J Biol Chem* 2000; 275: 22713-8.
9. Basañez G, Nechushtan A, Drozhinin O, et al. Bax, but not Bcl-x_L, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5492-7.
10. Fesik SW. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 2000; 103: 273-82.
11. Matsuyama S, Nouraini S, Reed JC. Yeast as a tool for apoptosis research. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 618-23.

lées [8]. L'ensemble de ces résultats a donc suggéré que la fonction pro-apoptotique de tcBid *in vivo* repose sur ses capacités conjointes d'interagir avec Bax par un mécanisme dépendant de BH3, et de déstabiliser les membranes lipidiques par un mécanisme semblable à celui décrit pour Bax [9].

La fonction des autres protéines « à BH-3 seulement » reste mal connue. Pour certaines d'entre elles (noxa, puma), le fait qu'elles soient réglées positivement par le facteur de transcription p53 suggère cependant un rôle important dans le déroulement du programme apoptotique.

A mesure que la recherche avance, le programme génétique responsable de la mort cellulaire par apoptose apparaît donc d'une admirable sophistication. Il recrute des partenaires organisés en une famille de protéines qui interviennent dans la plupart des compartiments cellulaires, et dont les fonctions s'enchevêtrent en un réseau apparemment inextricable. Une telle complexité est

probablement le garant de la capacité cellulaire de s'engager dans l'apoptose par des voies multiples, mais aussi de ne pas déclencher le programme quand il s'agit de répondre à des stress mineurs.

De quels outils disposons-nous alors pour pallier les dysfonctionnements d'un si vaste et si complexe échec ? L'élucidation du fonctionnement individuel de chacune des composantes apparaît comme un pré-requis indispensable. Les outils permettant l'étude de la fonction individuelle de ces protéines, tels que la biochimie structurale [10], le développement de modèles d'apoptose *in vitro* [7] ou l'utilisation de « tubes à essai cellulaires » comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* [11], deviennent indispensables pour que la mise en place des modèles de régulation s'accompagne d'une compréhension de ces phénomènes au niveau moléculaire, capable d'apporter les informations requises pour de nouvelles avancées thérapeutiques. ♦

BH3 only proteins of the Bcl-2 family

NOUVELLE

AIF, le facteur inducteur de l'apoptose, est tenu en échec par la protéine de stress Hsp70

Luigi Ravagnan, Sandeep Gurbuxani, Carmen Garrido, Guido Kroemer

> Les protéines de choc thermique (*heat shock proteins*, HSP), définies à l'origine pour leur rôle cytoprotecteur contre le choc thermique, constituent une classe de protéines très conservées dans l'évolution. Par la suite, ces protéines se sont avérées protéger les cellules contre un grand nombre d'autres agressions chimiques aussi bien que physiques, et ce par leur inhibition de l'apoptose [1, 2]. Toutefois, les cibles

moléculaires des HSP, en particulier celles de Hsp70 intervenant dans les voies d'induction de l'apoptose, ne sont connues que très partiellement. Deux équipes ont démontré de façon indépendante que Hsp70 peut interférer avec la formation du complexe activateur des caspases dénommé «apoptosome», composé du cytochrome c, de la protéine adaptatrice Apaf-1

(*apoptotic protein activating factor-1*) et de l'ATP. Hsp70 séquestre Apaf-1 et l'empêche de recruter la procaspase 9 au niveau de l'apoptosome, bloquant ainsi la cascade apoptotique dépendante des caspases [3, 4]. Apaf-1 n'est toutefois pas toujours nécessaire à l'effet cytoprotecteur de Hsp70 : nous avons montré en effet que la surexpression stable de Hsp70 dans des cellules

Apaf-1^{-/-} les protège de l'apoptose induite par la carence en facteurs de croissance [5]. Or, AIF (*apoptosis inducing factor*), un effecteur de la mort qui ne met pas en jeu la voie des caspases [6] s'est révélé indispensable, entre autres, dans le processus d'apoptose induit par la caren-

L. Ravagnan, G. Kroemer :
Cnrs, UMR 1599,
Institut Gustave Roussy,
Pavillon de Recherche 1,
39, rue Camille Desmoulins,
94805 Villejuif, France.
S. Gurbuxani, C. Garrido :
Inserm U517, Faculté de
Médecine et de Pharmacie,
7, boulevard Jeanne d'Arc,
21033, Dijon, France.

ce en facteurs de croissance [7, 8]. Il était donc plausible que Hsp70 puisse exercer un effet inhibiteur direct ou indirect sur AIF.

AIF : une nouvelle cible de Hsp70

Afin d'identifier une possible interaction fonctionnelle et/ou physique entre les deux protéines, nous avons tout d'abord travaillé dans un système acellulaire : la protéine AIF, sous forme naturelle, libérée des mitochondries, ou recombinante, provoque la condensation de la chromatine et la perte d'ADN de noyaux isolés. Ces stigmates d'apoptose nucléaire ne se produisent pas si AIF est préincubé avec Hsp70. Des expériences de co-immunoprécipitation, et de mesure d'interactions protéiques, montrent que AIF et Hsp70 peuvent interagir physiquement, et que cette interaction entre les deux protéines est directe. Cette association est spécifique de Hsp70 : la petite protéine de choc thermique Hsp27 ne protège pas les noyaux isolés de l'effet apoptotique de AIF, ce qui est conforme à nos précédents résultats [9], et AIF est incapable d'interagir avec d'autres Hsp (Hsp10, Hsp60) et notamment Hsp27 [9]. Un même effet inhibiteur de AIF par Hsp70 est également observé dans des cellules : la surexpression d'AIF provoque la mort cellulaire, mais cet effet cytotoxique est inhibé dans des cellules qui surexpriment de façon stable Hsp70. L'inhibition de AIF par Hsp70 est corrélée positivement avec l'interaction physique entre les deux protéines. La micro-injection de la protéine AIF recombinante dans le cytoplasme des cellules provoque la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et la condensation de la chromatine et du noyau, tous signes associés au processus apoptotique. Si Hsp70 est injectée simultanément à AIF, ou si AIF est injectée dans des cellules surexprimant

Hsp70, aucune de ces modifications mitochondriales et nucléaires ne se produit. En revanche, Hsp27 n'a aucun effet protecteur.

Comme d'autres Hsp, Hsp70 possède un domaine N-terminal de fixation de l'ATP (DFA) nécessaire à sa fonction de chaperon moléculaire, et un domaine C-terminal de fixation aux protéines (DFP) (Figure 1). Afin de préciser lequel de ces domaines interagissait avec AIF, nous avons utilisé des cellules exprimant soit la protéine Hsp70 entière, soit des mutants de Hsp70 porteurs de délétions dans le domaine DFA (Hsp70 Δ DFA) ou dans le domaine DFP (Hsp70 Δ DFP). Ces expériences démontrent que le domaine de fixation à l'ATP n'est pas requis pour le blocage de AIF par Hsp70, observation qui est en accord avec les expériences *in vitro* décrites ci-dessus, réalisées sur noyaux isolés en l'absence d'ATP. En revanche, le second domaine, DFP, s'avère nécessaire à l'inhibition par Hsp70 de l'effet cytotoxique de AIF. AIF peut se lier à Hsp70 entière et à Hsp70 Δ DFA, mais pas à Hsp70 Δ DFP. En revanche, l'interaction entre Hsp70 et Apaf-1 fait intervenir les deux domaines DFA et DFP et est, elle, dépendante de l'ATP [3, 4].

Rôle de la fonction chaperon dans l'inhibition de l'apoptose ?

Le terme de « chaperons moléculaires » attribué aux HSP vient de ce qu'elles favorisent le repliement correct des protéines, y compris après un stress cellulaire. Dans le cas de Hsp70, cette fonction requiert de l'ATP [10]. Quelle est la relation entre cette activité de chaperon moléculaire et la neutralisation des protéines pro-apoptotiques ? Nos résultats suggèrent que le blocage de AIF par Hsp 70 est indépendant de cette propriété, alors que la liaison avec Apaf-1 nécessite la présence de l'ATP et son domaine de fixation [3-5]. Nous avons étudié le comportement de Hsp70 et des deux mutants Hsp70 Δ DFA et Hsp70 Δ DFP dans des cellules exposées à différents inducteurs de l'apoptose (Figure 1). Lorsque l'apoptose est induite par la carence en facteurs de croissance, la ménadione, la vinblastine, la staurosporine [5] et la chaleur [11], le DFP est requis pour reproduire l'effet anti-apoptotique de Hsp70 entière, mais pas le DFA. Or, AIF est un partenaire important du processus apoptotique induit par les deux premiers inducteurs [8] et, dans certains cas, par la staurosporine [6]. Dans ce modèle, AIF serait la cible principale de Hsp70.

Protéine	Interaction avec	Inhibition de l'apoptose induite par
 Hsp70	AIF Apaf-1*	Transfection de AIF, carence en sérum, ménadione, staurosporine, vinblastine, étoposide*, cisplatine*, doxorubicine*
 Hsp70 Δ DFA	AIF	Transfection de AIF, carence en sérum, ménadione, staurosporine, vinblastine
 Hsp70 Δ DFP	—	—

Figure 1. Domaines de la Hsp70 requis pour l'inhibition fonctionnelle de AIF, pour l'interaction avec AIF ou Apaf-1 et pour l'inhibition de l'apoptose face à différents inducteurs. Les constructions représentées ont été exprimées de façon stable dans la lignée cellulaire ME-180. La capacité de protection des différentes formes de Hsp70 contre la mort induite par la transfection de AIF ou les autres inducteurs a été mesurée, ainsi que la capacité d'interaction avec AIF ou Apaf-1. Le DFP est strictement nécessaire pour l'effet inhibiteur de Hsp70. En revanche, le DFA, qui est requis pour la fonction de chaperon moléculaire, n'est pas nécessaire pour bloquer la mort induite par la transfection de AIF, la carence en sérum, la ménadione, la staurosporine et la vinblastine. DFP: domaine de fixation des protéines; DFA: domaine de fixation de l'ATP.



Ces études révèlent donc que deux molécules phylogénétiquement très anciennes comme AIF [12] et Hsp70 [13] participent à la régulation de l'apoptose mais que cette activité ne met pas en jeu leurs fonctions enzymatiques connues : oxydoréductase pour AIF [14] et chaperon

moléculaire dépendante de l'ATP pour Hsp70 [10]. Ces observations pourraient aussi suggérer que le blocage de l'interaction entre Hsp70 et AIF pourrait faciliter l'induction thérapeutique de l'apoptose, notamment dans les nombreux cancers qui surexpriment Hsp70. ♦

- Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 ; 286 : 433-42.
- Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 2000 ; 92 : 1564-72.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000 ; 2 : 469-75.
- Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2000 ; 2 : 476-83.
- Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 2001 ; 3 : 839-43.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999 ; 397 : 441-6.
- Coulombel L. AIF est impliqué dans un processus d'apoptose embryonnaire. *Med Sci* 2001 ; 4 : 533-4.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001 ; 410 : 549-54.
- Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2001 ; 2 : 645-52.
- Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 1993 ; 27 : 437-96.
- Li GC, Li L, Liu RY, Rehman M, Lee WM. Heat shock protein hsp70 protects cells from thermal stress even after deletion of its ATP-binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 2036-40.

Induction of apoptosis by AIF is blocked by hsp70

REMERCIEMENTS

Nous remercions nos collaborateurs S. Susin, N. Zamzami, E. Daugas, C. Maise, N. Larochette (Cnrs, UMR 1599), M. Jäättelä (Danish Cancer Society, Danemark), T.W. Mak et J.M. Penninger (Amgen Institute, Canada).

- Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 1999 ; 6 : 516-24.
- Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988 ; 22 : 631-77.
- Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, et al. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 16391-8.

NOUVELLE

Le gène *sox9* induit la formation de testicules chez des souris transgéniques de génotype XX

Valérie P.I. Vidal, Marie-Christine Chaboissier, Andreas Schedl

The International Centre for Life Institute of Human Genetics, Central Parkway, Newcastle upon Tyne, NE1 3BZ, Royaume-Uni.
andreas.schedl@ncl.ac.uk

> Chez les mammifères, lors du développement, les gonades mâles et femelles sont morphologiquement identiques et appelées gonades indifférenciées. Ensuite, la gonade se développera soit en testicule, soit en ovaire selon que le chromosome Y sera présent ou absent. On sait depuis une décennie que le gène *sry* (*sex-determining region of the Y chromosome*), responsable de la formation des testicules par l'intermédiaire d'une cascade d'événements morphogé-

nétiques, est localisé sur le chromosome Y. Des souris transgéniques de génotype XX, dans les gonades desquelles on force l'expression de *Sry*, présentent une inversion du sexe: elles possèdent des testicules à la place d'ovaires [1]. La protéine SRY contient une séquence consensus HMG (*high mobility group*) lui permettant de se lier aux molécules d'ADN et d'en infléchir la courbure, ce qui suggère qu'elle pourrait avoir un effet sur la transcription de gène(s). Les

cibles moléculaires directes de SRY restent toutefois méconnues. *sox9* est un bon candidat: il est transcrit en particulier dans les gonades où son expression augmente fortement et uniquement chez les embryons mâles juste après l'activation de *SRY*. Dans les testicules, *sox9* est exprimé

dans les cellules de Sertoli, lesquelles contribuent à la formation de ces organes.

Chez l'homme, *sox9* semble impliqué dans le développement des organes sexuels puisque des anomalies d'expression de ce gène entraînent des inversions de sexe. C'est le cas de 75 % des individus XY présentant soit une mutation ou une délétion d'un allèle du gène *SOX9*, soit un réarrangement de la partie 5' non codante. Tous ces individus