

■ *Anti-caspases et lésions ischémiques : quelles perspectives thérapeutiques ?*

*B. Onténiente**

La possibilité de maîtriser les mécanismes moléculaires de l'apoptose a ouvert des perspectives thérapeutiques sans précédent dans le domaine des pathologies neurodégénératives. Parmi ces mécanismes, ceux impliquant les caspases suscitent l'enthousiasme d'un grand nombre de laboratoires académiques et privés, avec à la clé la définition de nouvelles stratégies neuroprotectrices pour les lésions ischémiques.

L'une des avancées majeures de la neurobiologie au cours de ces 10 dernières années fut l'établissement d'un parallèle entre la mort neuronale développementale et celle observée

dans les pathologies neurologiques de l'adulte. Durant la période développementale, la neurogenèse produit des neurones en surnombre. Une grande partie – parfois plus de la moitié – de ces jeunes neurones sont éliminés juste après leur différenciation, durant la phase de structuration des connexions nerveuses, ou synaptogenèse. Cet épuration s'effectue par une modalité de mort cellulaire codifiée, appelée mort développementale, mort cellulaire programmée ou "apoptose". Dans l'organisme adulte, l'apoptose est nécessaire à différentes fonctions physiologiques pour lesquelles une perte cellulaire est bénéfique, comme la désactivation du système immunitaire ou le renouvellement de l'épithélium intestinal. À l'inverse, l'apoptose est dommageable lorsqu'elle s'adresse à des populations cellulaires incapables de renouvellement, tels les neurones. Pour les contenir quasiment tous, l'apoptose dépasse en complexité l'ensemble des mécanismes biologiques connus. Elle représente une formidable boîte de Pandore dont les secrets intéressent de nombreuses disciplines médicales, cancérologie, immunologie, cardiologie, hépatologie et neurologie en tête. Qu'il



* INSERM U421/IM3,
Université Paris-Val-de-Marne, Créteil.

s'agisse d'inverser ou au contraire d'amplifier le phénomène, chacune des étapes du processus apoptotique mobilise une myriade de molécules qui sont autant de cibles thérapeutiques potentielles. L'apoptose est aussi un phénomène progressif, entrecoupé de moments de "reflexion" durant lesquels s'opposent les voies intracellulaires pro- ou antiapoptotiques, avant que la balance de leurs efforts décide de la poursuite ou de l'arrêt du processus. Cette progression erratique s'étale sur plusieurs heures, parfois plusieurs jours, selon la sévérité de l'atteinte cellulaire, ce qui est un atout majeur dans la définition de stratégies thérapeutiques dirigées vers des pathologies pour lesquelles le facteur temps est limitant, comme les accidents vasculaires cérébraux (AVC). On sait aujourd'hui que l'apoptose est impliquée dans la quasi totalité des maladies neurodégénératives, qu'elles soient progressives ou aiguës (1) [tableau I]. Parmi les familles moléculaires qu'elle mobilise, deux sont considérées comme prometteuses pour la définition d'outils thérapeutiques : celle de Bcl-2 et celle des caspases. Les inhibiteurs de Bcl-2 sont principalement développés dans l'optique d'une limitation de la prolifération cellulaire dans les cancers. À l'inverse, la recherche sur les caspases analyse le potentiel thérapeutique de leurs inhibiteurs pour le traitement des lésions aiguës et progressives du système nerveux central.

L'APOPTOSE DANS LES LÉSIONS ISCHÉMIQUES

L'apoptose se distingue des autres types de mort cellulaire par différents critères moléculaires, dont la fragmentation internucléosomale de l'ADN. La mise en évidence de ces fragments fut le premier indice d'une participation de l'apoptose aux lésions ischémiques. Ils ont été retrouvés chez l'homme (2) ainsi que dans tous les modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale, et s'observent en particulier après ischémie globale dans le champ CA1 de l'hippocampe et dans la pénombre des lésions focales. L'apoptose étant un processus évolutif, la pénombre a longtemps été considérée comme la seule région susceptible de bénéficier d'un traitement neuroprotecteur, alors que le cœur d'un infarctus semblait hors de portée thérapeutique du fait de sa nature nécrotique. De multiples observations structurales et biochimiques remettent actuellement en cause cette dichotomie. Les neurones présents au cœur d'un infarctus comportent en fait certaines des caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose, comme la condensation cytoplasmique et nucléaire et l'activation de différentes familles moléculaires, dont celle de Bcl-2 et celle des caspases (3). L'intégrité membranaire est préservée, alors que les membranes sont dégradées dans la nécrose. Le cœur d'un infarctus comporte donc des traits apoptotiques et serait, au même titre que la pénombre, susceptible d'être protégé par des agents antiapoptotiques si l'administration des drogues pouvait être effectuée à temps.

Tableau I. L'apoptose dans les pathologies neurologiques et les modèles animaux.

Pathologies	Modèles animaux
Maladie de Huntington	Administration de toxines mitochondriales ou d'excitotoxines
Maladie d'Alzheimer	Animaux âgés, mutations ou délétions génétiques de type Alzheimer
Maladie de Parkinson	Infections virales
Infections virales	Prion
Encéphalopathie spongiforme	Axotomie
Sclérose en plaques	Neuropathies du motoneurone
Sclérose latérale amyotrophique	Stress
Trauma	Trauma
Accidents vasculaires cérébraux	Ischémie cérébrale focale et globale

LA MACHINE PROTÉOLYTIQUE PARFAITE

Les caspases forment une famille de protéases (ases) à cystéine (c) qui clivent leur substrats après un résidu aspartate (asp). Elles sont présentes dans le cytoplasme, le noyau, le reticulum endoplasmique et la mitochondrie de toutes les cellules nucléées, sous la forme d'un précurseur inactif qui possède un prodomaine ainsi qu'une petite et une grande sous-unités (figure 1). Après double protéolyse, les sous-unités s'assemblent pour former un hétéroté-

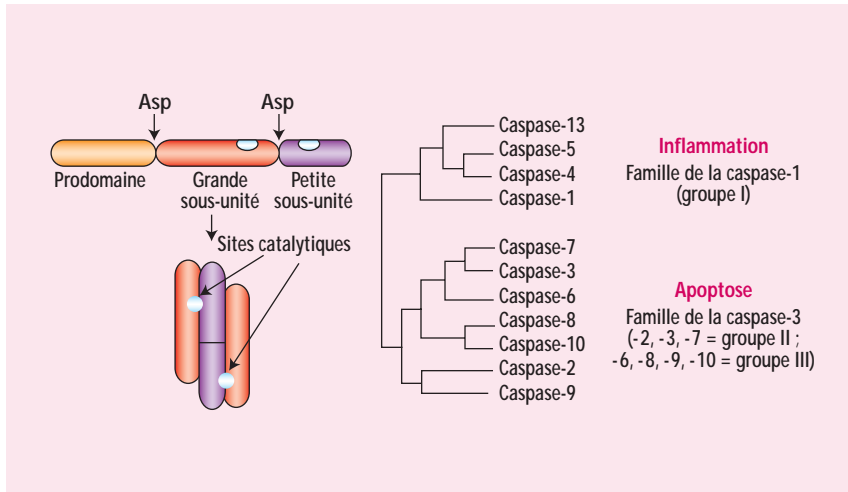


Figure 1. Les caspases actives se présentent sous la forme d'un hétérotétramère formé après clivage du zymogène aux sites aspartate et réassemblage des sous-unités courte et longue. Elles sont classées selon leur homologie de séquence et leur séquence préférentielle de clivage en trois groupes : I, II et III. Les caspases du groupe I, outre leur rôle dans l'apoptose, participent aux réactions inflammatoires.

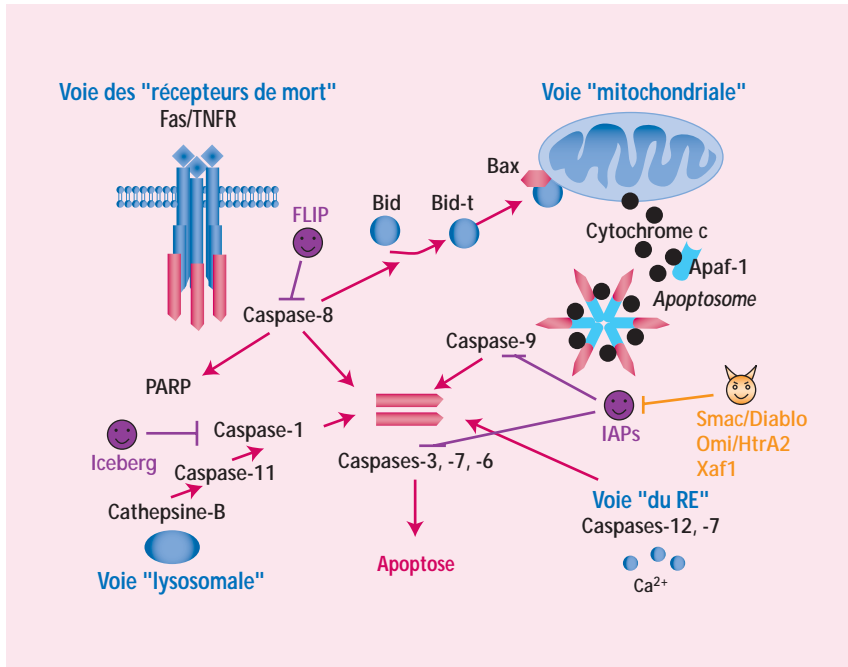


Figure 2. Les principales voies d'activation des caspases. Les caspases sont activées en réponse à des stimuli provenant de l'extérieur, voie des récepteurs de mort, ou de l'intérieur de la cellule, autres voies. Les caspases apicales, initiatrices des cascades – caspases-8, -11, -12 et -9 – ont pour cible les caspases effectrices – caspases-3, -7, -6 –, mais peuvent également jouer un rôle d'effecteur en clivant des substrats spécifiques – PARP pour la caspase-8 –, ou un rôle d'amplificateur, activation de Bid par la caspase-8. Les cascades sont entretenues par des boucles de rétroactivation et sont contrôlées par des inhibiteurs, FLIP, Iceberg, IAPs, eux-mêmes sous contrôle d'anti-inhibiteurs, Smac/Diablo, Omi/HtrA2.

tramère actif. Les caspases possédant elles-mêmes un résidu cystéine sur leur site d'activation, elles peuvent s'autoactiver ou s'activer mutuellement en cascades. Ce mode d'action en synergie et en boucles de rétroactivation leur confère une redoutable efficacité. Elles peuvent induire, amplifier et exécuter le processus de mort par :

- l'activation de différentes voies proapoptotiques ;
- le clivage direct d'un nombre de substrats estimé à plus de 200 ;
- l'inactivation des mécanismes de défense de la cellule (4).

On distingue deux voies principales d'activation des caspases : la voie des "récepteurs de mort" et la "voie mitochondriale", qui mobilisent respectivement en position apicale les caspases-8, -2 ou -10 et la caspase-9 (figure 2). La voie des récepteurs de mort est activée par la stimulation des membres de la super-famille de récepteurs du *tumor necrosis factor* [TNF] (5). Une fois activée, la caspase initiatrice enclenche une réaction en chaîne qui inclut les caspases effectrices situées en aval, mais aussi des substrats spécifiques qui vont soit amplifier le processus apoptotique en renforçant la voie mitochondriale [activation de Bid] (figure 2), soit participer directement au démantèlement de la cellule en inhibant les systèmes de réparation de l'ADN (4). La voie mitochondriale est activée par des atteintes telles que le stress ischémique/hypoxique, la privation en facteurs trophiques, la chimiothérapie ou l'irradiation. Elle se traduit par la libération cytosolique de molécules normalement contenues dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie, comme les caspases-9 et -2, AIF (*apoptosis inducing factor*), qui induit les premiers clivages de l'ADN, et le cytochrome c, élément clé de la chaîne respiratoire. Une fois dans le cytoplasme, le cytochrome c est complexé à Apaf-1 et à la procaspase-9 dans un ensemble moléculaire appelé l'apoptosome. La caspase-9 est alors activée et entraîne le clivage d'autres caspases, dont les caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7), qui vont achever le démantèlement cellulaire en clivant leurs propres substrats et en entretenant les boucles de rétroactivation.

LES CASPASES DANS LES LÉSIONS ISCHÉMIQUES

Les premières données mettant en évidence l'importance des caspases dans la constitution des lésions ischémiques proviennent de travaux fondés sur l'inhibition de leur activité par des séquences tétrapeptidiques identiques à leur site préférentiel de clivage (6), ou d'animaux porteurs de modifications génétiques. La délétion des gènes des caspases est létale durant la période embryonnaire ou périnatale, mais les études sont possibles sur les animaux hétérozygotes qui survivent, et sur des animaux porteurs de mutants dominants négatifs. L'obtention d'anticorps dirigés contre les pré-curseurs ou les formes actives des caspases a par la suite permis d'identifier et de localiser les cellules qui les contiennent, et de quantifier l'évolution des clivages. Les caspases actives s'observent principalement dans les neurones et les oligodendrocytes, à la fois dans le cœur et la pénombre après ischémie focale, avec des décours et une amplitude spécifiques à chaque type d'atteinte. L'expression des caspases par les astrocytes semble restreinte aux situations d'ischémie globale.

Nous possédons grâce à cet ensemble de données expérimentales une image dynamique de la participation des caspases aux lésions ischémiques de différentes étiologies, substrat sur lequel se sont développées les approches neuroprotectrices fondées sur l'inhibition de leurs activités.

ANTICASPASES : QUELLES PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES POUR LES AVC ?

Bien que ces données soient extrêmement encourageantes, les composés ayant donné des résultats expérimentaux positifs en matière de neuroprotection des AVC sont légion et, jusqu'à présent, aucune des stratégies élaborées sur cette base n'a pu être transposée avec succès à la clinique. Ce triste constat a cependant des explications rationnelles, qui n'incombent pas toutes aux modèles expérimentaux et dont il convient de

tirer les leçons. Par rapport à ses prédécesseurs, l'approche "anticaspase" possède trois atouts : le fait que les caspases soient impliquées quel que soit le type d'atteinte dès le début et tout au long du processus apoptotique, le fait que la longueur de ce processus ouvre plus largement la fenêtre thérapeutique et le fait que les caspases puissent être inhibées par des séquences tétrapeptidiques courtes. Cependant, pour permettre une voie d'apport systémique, les inhibiteurs ont été administrés en fortes concentrations, ce qui s'est inévitablement traduit par une perte de sélectivité pour leur cible et une interaction avec d'autres protéases à cystéine, affectant des fonctions cellulaires vitales. On a également reproché aux peptides synthétiques le fait de retarder la mort cellulaire sans la supprimer, ou encore le fait que les cellules survivantes soient non fonctionnelles. Pour donner un exemple de ce dernier point, l'inhibition des caspases dans un modèle d'ischémie globale réduit bien la perte neuronale observée dans le champ CA1 de l'hippocampe, mais n'annule pas les déficits mnésiques induits par la lésion (7).

Plusieurs compagnies pharmaceutiques, dont IDUN Pharm. Inc., Vertex Pharm. Inc./Serono et Merck Frosst, se sont attachées à ce problème à travers l'élaboration de familles de peptido-mimétiques de plus petite taille et dénués d'effets indésirables. La première génération de peptido-mimétiques développés par Merck Frosst (inhibiteur direct tel que le MF432, ou indirect tel que le MF425) présentaient encore des problèmes de spécificité, qui semblent avoir été résolus avec les nouveaux inhibiteurs réversibles, tel le M826, qui s'oppose à la caspase-3 avec une bonne sélectivité (IC_{50} : 0,005 μ M, contre 2,1 pour la caspase-8) et est 50 fois plus efficace que le tétrapeptide z-DEVD-fmk. Une injection intracérébrale unique de M826 réduit de 25 % (cortex et hippocampe) à 30 % (striatum) les lésions induites par hypoxie-ischémie chez l'animal nouveau-né (8). IDUN Pharm. Inc. a développé des peptido-mimétiques irréversibles à large spectre, qui sont actifs dans différents types cellulaires (9). Vertex Pharm.

Inc. s'intéresse surtout à la caspase-1 et a développé des inhibiteurs synthétiques dipeptidiques, qui font actuellement l'objet d'un essai clinique de phase II dans l'arthrite rhumatoïde (en association avec Avantis), ce qui est justifié par l'implication de la caspase-1 dans l'inflammation. Sunesis Pharm. Inc. développe pour sa part des inhibiteurs non peptidiques qui semblent avoir une sélectivité et une efficacité intéressantes (10). Le composé le plus efficace de la série est le 66b, qui possède un IC_{50} de 20 nM et une sélectivité pour la caspase-3 de 500 à 800 fois supérieure à celle des autres caspases.

CONCLUSION

Les développements récents en matière de stratégies à visée neuroprotectrice pour les AVC montrent qu'une nouvelle ère s'est ouverte dans la définition des cibles thérapeutiques. La recherche de composés interférant avec les mécanismes de dégénérescence s'est élargie aux voies moléculaires de l'apoptose, en prenant appui sur une somme de renseignements scientifiques sans précédent du fait de l'implication de ces mécanismes dans un grand nombre de pathologies, y compris des pathologies non neurologiques. Des drogues proapoptotiques sont déjà en cours d'utilisation pour le traitement de certains cancers, et la mise au point de molécules antiapoptotiques pour des applications qui incluent les pathologies neurodégénératives est d'actualité dans l'industrie. Les lésions aiguës du système nerveux central

apparaissent ainsi en bonne position pour bénéficier d'une ouverture thérapeutique à une échéance qu'il est encore difficile de préciser, mais qui n'appartient plus au domaine de la fiction.

RÉFÉRENCES

1. Yuan Y, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000;407:802-9.
2. Love S. Apoptosis and brain ischemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:267-82.
3. Benchoua A, Guegan C, Couriaud C et al. Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci* 2001;21:7127-34.
4. Onténiente B, Rasika S, Benchoua A et al. Molecular pathways in cerebral ischemia: cues to novel therapeutic strategies. *Mol Neurobiol* 2003;27:33-72.
5. Micheau O, Lens S, Gaide O et al. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol cell Biol* 2001;21:5299-305.
6. Plesnila N, Moskowitz MA. Caspases in cerebral ischemia. In: Kriegstein J, Klumpp S (eds). *Pharmacology of cerebral ischemia*. Humana Press, 2000.
7. Gillardon F, Lenz C, Waschke KF et al. Altered expression of Bcl-2, Bcl-X, Bax, and c-Fos colocalizes with DNA fragmentation and ischemic cell damage following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1996;40:254-60.
8. Han BH, Xu D, Choi J et al. Selective, reversible caspase-3 inhibitor is neuroprotective and reveals distinct pathways of cell death after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Biol Chem* 2002;277:30128-36.
9. Linton SD, Karanewsky DS, Ternansky RS et al. Acyl dipeptides as reversible caspase inhibitors. Part 1: Initial lead optimization. *Bioorg Med Chem Lett* 2002;12: 2969-71.
10. Choong IC, Lew W, Lee D et al. Identification of potent and selective small-molecule inhibitors of caspase-3 through the use of extended tethering and structure-based drug design. *J Med Chem* 2002;45: 5005-22.