

## Un rôle pour la protéine FAN (factor associated with neutral sphingomyelinase activation) dans la signalisation de l'apoptose

L'interaction du TNF avec son récepteur de 55 kDa (TNF-RI) joue un rôle majeur dans le déclenchement des voies de signalisation conduisant à l'apoptose. Un des mécanismes maintenant bien connu est le recrutement, par l'intermédiaire du domaine de mort du TNF-RI, de protéines adaptatrices qui elles-mêmes recrutent la pro-

caspase 8. Plus récemment, il a été montré que le TNF-RI interagit avec une autre protéine, FAN, qui active une sphingomyélinase neutre, déclenchant ainsi une autre voie de signalisation, la voie sphingomyéline-céramide. Nous démontrons maintenant que la protéine FAN est impliquée dans l'apoptose induite par les récepteurs TNF-RI et CD40.

Le TNF (*tumor necrosis factor*) active plusieurs voies de transduction du signal qui sont impliquées dans l'activité antitumorale, la croissance cellulaire et toute une série de réponses inflammatoires et immunitaires (*m/s* 1997, n° 1, p. 83). Le TNF exerce ses effets par l'intermédiaire de deux récepteurs distincts, l'un de 55 kDa (TNF-RI) et l'autre de 75 kDa (TNF-R2). Les avancées majeures réalisées dans la compréhension de la signalisation induite par le TNF-RI ont été accomplies par l'identification de domaines cytoplasmiques aux fonctionnalités distinctes (*m/s* 1997, n° 1, p. 83). En effet, le domaine cytoplasmique de TNF-RI est dépourvu de toute activité enzymatique, et c'est le recrutement de protéines cytoplasmiques, appelées protéines adaptatrices, qui détermine la réponse cellulaire à l'interaction ligand-récepteur. Un motif de 80 acides aminés, le domaine de mort (*death domain*) situé dans l'extrémité carboxy-terminale intracellulaire du TNF-RI, était considéré jusqu'à présent comme indispensable au déclenchement de l'apoptose induite par le TNF. En effet, la transmission du signal apoptotique par le domaine de mort du TNF-RI implique l'interaction de ce dernier avec un domaine homologue de la protéine TRADD (*TNF-R associated death domain protein*); TRADD s'associe à son tour, par son domaine

de mort, à la protéine FADD (*fas associated death domain*) (*m/s* 1995, n° 8, p. 1178) qui permet le recrutement de la pro-caspase-8, ce qui déclenche la cascade protéolytique des caspases conduisant à l'apoptose (*m/s* 1998, n° 14, p. 9). Des données récentes suggèrent qu'une autre protéine cytoplasmique, FAN (*factor associated with neutral-sphingomyelinase activation*), pourrait jouer un rôle majeur dans le déclenchement de l'apoptose provoquée par l'engagement du TNF-RI.

### Interaction du TNF-RI et de la protéine FAN

Une deuxième région importante dans le domaine cytoplasmique du récepteur TNF-RI est le motif NSD (*neutral sphingomyelinase domain*), qui est capable de lier spécifiquement la protéine FAN (*factor associated with neutral-sphingomyelinase activation*). Cette protéine a été isolée par la technique du double hybride en utilisant comme appât des séquences intracellulaires du TNF-RI [1]. FAN est constituée de 917 acides aminés soit une masse moléculaire théorique de 104 kDa. L'analyse de sa séquence révèle la présence, au niveau de sa portion carboxy-terminale, de cinq domaines riches en tryptophane et en acide aspartique (domaines WD). De tels domaines WD sont présents dans différentes protéines impliquées

dans le contrôle de cascades de signalisation et facilitent les interactions protéine-protéine. Dans le cas de la protéine FAN, ils sont nécessaires à son interaction constitutive avec le motif NSD du TNF-RI [2]. Le domaine effecteur de FAN se localise dans la partie amino-terminale de la protéine. En effet, la délétion de cette région, qui contient un domaine BEACH (*Beige And Chediak-Higashi*) dont la fonction est encore inconnue, lui confère une propriété de dominant négatif (*figure 1*) [1].

### Autres récepteurs interagissant avec la protéine FAN

Le récepteur TNF-RI n'est pas le seul récepteur membranaire qui interagit avec FAN. Des études d'immunoprécipitation nous ont permis de mettre en évidence l'interaction constitutive de la protéine FAN avec le récepteur CD40, un membre de la superfamille du TNF-RI. La séquence QETLH du CD40, qui présente des homologies avec le motif NSD du TNF-RI, pourrait être impliquée dans cette interaction [3]. Des travaux récents montrent que FAN pourrait aussi interagir avec d'autres types de récepteurs, comme certains récepteurs couplés aux protéines G. En particulier, l'incubation d'astrocytes en présence de THC ( $\Delta 9$ -Tétrahydrocannabinol), le principal consti-

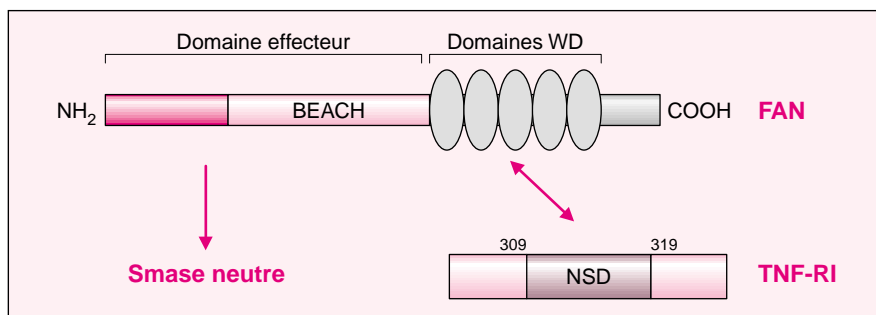


Figure 1. **Structure de la protéine FAN.** La protéine FAN possède, au niveau de sa portion carboxy-terminale, cinq domaines riches en tryptophane et en acide aspartique (domaines WD), nécessaires à son interaction constitutive avec le domaine NSD (neutral sphingomyelinase domain) du récepteur I du TNF (TNF-R1). Le domaine effecteur de FAN, requis pour la stimulation de la sphingomyélinase (Smase) neutre en réponse au TNF, se localise dans la partie amino-terminale de la protéine.

tuant actif de la marijuana, favorise le recrutement de FAN au niveau du récepteur 1 des cannabinoïdes (*cannabinoid receptor 1-CB1*), un récepteur couplé aux protéines Gi/o [4].

### La protéine FAN est nécessaire à l'activation d'une sphingomyélinase neutre par le TNF

Différentes sphingomyélinases, dont le pH optimum est soit neutre soit acide, ont été impliquées dans l'activation de la voie de signalisation dite « voie sphingomyéline-céramide ». Cette voie consiste en l'hydrolyse transitoire de la sphingomyéline par une sphingomyélinase, avec production de céramide, un second messager sphingolipidique (*m/s 1996, n° 11, p. 1219*) [5]. La mise en évidence d'une interaction entre la protéine FAN et le motif NSD du TNF-R1 suggère que FAN joue un rôle dans l'activation d'une sphingomyélinase neutre par le TNF [1, 2]. En accord avec cette hypothèse, la surexpression dans des cellules COS de la protéine FAN sauvage potentialise une activité sphingomyélinase neutre en réponse au TNF, tandis que la forme tronquée, agissant comme un dominant négatif, prévient ce phénomène [1]. Des études réalisées à partir de fibroblastes et de thymocytes issus de souris déficitaires en FAN ont confirmé le rôle de cette protéine dans le contrôle de l'activation d'une sphingomyélinase neutre par le TNF

[6]. Enfin, la surexpression dans des fibroblastes humains transformés par l'antigène T de SV40, d'une forme tronquée de FAN agissant comme dominant négatif, abolit l'activation de la voie sphingomyéline-céramide consécutive à l'engagement du TNF-R1 [7]. Des résultats similaires ont été obtenus avec les deux autres récepteurs connus pour interagir avec FAN, CD40 et le récepteur 1 des cannabinoïdes.

### Rôle de FAN *in vivo*

Afin de préciser la fonction de la protéine FAN, l'équipe de Martin Krönke (Cologne, Allemagne) a produit des souris dont le gène codant pour cette protéine a été invalidé par recombinaison homologue. Les souris mutantes n'ont pas d'anomalies du développement ni d'altérations phénotypiques marquées. Toutefois, ces souris présentent des anomalies cutanées, notamment un défaut de réparation de la barrière épidermique, qui sont corrélées avec une prolifération ralentie des kératocytes. Ceci suggère un rôle de la protéine FAN dans le contrôle de l'homéostasie de l'épiderme [6]. Il semblerait que le déficit en protéine FAN s'accompagne d'autres modifications phénotypiques. En particulier, la réponse lymphocytaire B semble altérée chez les souris mutantes. Cette observation renforce l'hypothèse selon laquelle la protéine FAN est requise dans la signalisation

par CD40, récepteur impliqué dans le contrôle de l'activation des lymphocytes B.

### FAN participe à la signalisation apoptotique du TNF-R1 et du CD40

Étant donné l'implication potentielle du céramide dans la signalisation pro-apoptotique (*m/s 1996, n° 11, p. 1219*) [8], nous avons cherché à évaluer le rôle de FAN dans l'apoptose provoquée par l'engagement de CD40 et du TNF-R1. Dans un premier temps, nous avons montré que la surexpression d'un dominant négatif de FAN inhibe partiellement l'apoptose de fibroblastes humains transformés en réponse au ligand de CD40 [3] et au TNF [7]. De plus, des fibroblastes transformés issus de souris invalidées pour FAN sont significativement résistants à la toxicité provoquée par des agonistes spécifiques de CD40 et du TNF-R1. Enfin, la correction génétique de ces cellules restaure leur sensibilité vis-à-vis du TNF.

En accord avec ces résultats, le groupe de David Goeddel (San Francisco, États-Unis) avait montré que la délétion d'une région du TNF-R1 contenant le motif NSD diminue d'environ 50 % l'effet toxique du TNF, alors que la délétion du domaine de mort prévient complètement ce phénomène [9]. Il semble que le domaine de mort soit certes nécessaire mais pas suffisant pour transmettre pleinement la toxicité induite par le TNF. Il apparaît que la signalisation pro-apoptotique déclenchée par la liaison du TNF à son récepteur TNF-R1 résulte de l'association de signaux émanant d'une part du domaine de mort et d'autre part d'une voie dépendante de l'interaction de FAN avec le motif NSD.

### FAN et l'activation des caspases

Il semble que FAN agisse en amont de l'activation des caspases initiateur et effectrice de l'apoptose, les caspases 8 et 3, respectivement. En effet, dans des fibroblastes transformés, les cinétiques d'activation des caspases 3 et 8 sont similaires. Ceci suggère que la caspase 8 n'est probablement pas située à l'apex de la cascade protéoly-

tique mais pourrait être clivée de façon indirecte. En outre, la surexpression d'un dominant négatif de FAN ou l'absence de cette protéine prévient l'activation des caspases 3 et 8 consécutive à l'engagement du TNF-RI. Ce processus semble lié à une inhibition de la libération du cytochrome *c* de la mitochondrie vers le cytosol. A cet égard, on peut aussi souligner que la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 inhibe la protéolyse des caspases 3 et 8 induite par le TNF, suggérant un rôle essentiel de la mitochondrie dans le déclenchement de la cascade des caspases. Ainsi, la transmission du signal apoptotique en réponse au TNF indiquerait que les fibroblastes transformés se comporteraient comme des cellules de type II selon la classification établie par le groupe de Marcus Peter (Chicago, États-Unis). Ce dernier avait en effet montré que l'activation de Fas, un autre récepteur contenant un domaine de mort, pouvait déclencher deux voies distinctes de signalisation de l'apoptose, une voie indépendante (cellules de type I), et une autre dépendante des mitochondries (cellules de type II) [10].

Les mécanismes moléculaires par lesquels FAN provoque la libération du cytochrome *c* restent à élucider. La production de céramide due à la stimulation d'une sphingomyélinase neutre sous le contrôle de FAN, pourrait être impliquée (figure 2) [7]. En effet, de nombreuses études suggèrent que les seconds messagers sphingolipidiques, céramide et sphingosine, participent à l'induction de l'apoptose *via* l'activation des caspases par un mécanisme dépendant du relargage du cytochrome *c* dans le cytosol [11].

Toutefois, nous n'excluons pas l'existence d'une autre voie de signalisation pro-apoptotique contrôlée par la protéine FAN et indépendante de la voie sphingomyéline-céramide. En particulier, la protéine FAN pourrait favoriser le recrutement successif des protéines TRADD, FADD et de la pro-caspase 8 au niveau du domaine de mort du TNF-RI (figure 2). Cependant, différents arguments expérimentaux vont à l'encontre de cette hypothèse. En effet, l'activation de

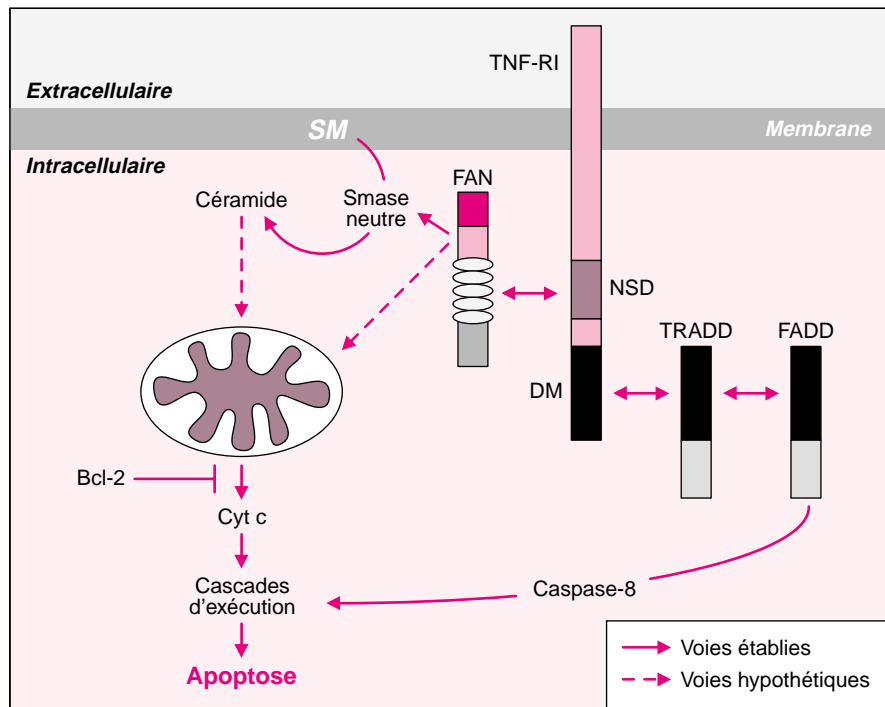


Figure 2. **Rôle de la protéine FAN dans la signalisation pro-apoptotique du TNF-RI.** La protéine FAN, requise pour l'activation de la SMase neutre en réponse au TNF, participe à la signalisation pro-apoptotique induite par cette cytokine. Le céramide, produit probablement au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique, pourrait contribuer à la libération du cytochrome *c* dans le cytosol et à l'activation consécutive des caspases d'exécution. DM: domaine de mort; NSD: neutrophilic sphingomyelinase domain; TRADD: TNF receptor associated death domain protein; FADD: Fas associated death domain; SM: sphingomyéline.

certaines voies de signalisation par le TNF, décrites comme dépendantes de l'interaction du TNF-RI avec les protéines TRADD (activation de NF- $\kappa$ B) [12] et FADD (activation de la sphingomyélinase acide) [13], ne semblent pas altérées dans les cellules qui surexpriment un dominant négatif de FAN ou dans les cellules déficitaires en FAN [1, 2, 7].

En conclusion, les diverses données expérimentales attestant un rôle de la protéine FAN dans la régulation de la prolifération et de la mort cellulaire programmée suggèrent une implication potentielle d'une sphingomyélinase neutre et des sphingolipides dans le contrôle de ces processus biologiques. La caractérisation de cette sphingomyélinase neutre dont l'activité est contrôlée par FAN contribuera à déterminer les fonctions réelles de cette phospholipase à

l'échelle moléculaire, cellulaire et intégrée. D'autre part, une étude plus approfondie du phénotype des souris déficitaires en FAN devrait permettre de clarifier le rôle physiologique de cet adaptateur et de la sphingomyélinase neutre, notamment dans le contrôle de la réponse immunitaire ■

#### Remerciements

Les auteurs remercient les autres membres de l'équipe pour leur contribution à ce travail. Ces recherches ont bénéficié du soutien de l'Inserm, de l'Université Paul Sabatier, de l'ARC et de la FRM.

## RÉFÉRENCES

1. Adam-Klages S, Adam D, Wiegmann K, *et al.* FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* 1996; 86: 937-47.
2. Adam D, Wiegmann K, Adam-Klages S, Ruff A, Kronke M. A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway. *J Biol Chem* 1996; 1996: 14617-22.
3. Ségui B, Andrieu-Abadie N, Adam-Klages S, *et al.* CD40 signals apoptosis through FAN-regulated activation of the sphingomyelin-ceramide pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 37251-8.
4. Sanchez C, Rueda D, Ségui B, *et al.* The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein fan. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 955-9.
5. Levade T, Jaffrézou JP. Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim Biophys Acta* 1999; 1438: 1-17.
6. Kreder D, Krut O, Adam-Klages S, *et al.* Impaired neutral sphingomyelinase activation and cutaneous barrier repair in FAN-deficient mice. *EMBO J* 1999; 18: 2472-9.
7. Ségui B, Cuwillier O, Adam-Klages S, *et al.* Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *J Clin Invest* 2001; 108: 143-51.
8. Hannun YA, Luberto C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 73-80.
9. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GHW, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993; 74: 845-53.
10. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, *et al.* Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998; 17: 1675-87.
11. Cuwillier O, Edsall L, Spiegel S. Involvement of sphingosine in mitochondria-dependent Fas-induced apoptosis of type II Jurkat T cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 15691-700.
12. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 1995; 81: 495-504.
13. Wiegmann K, Schwandner R, Krut O, *et al.* Requirement of FADD for tumor necrosis factor-induced activation of acid sphingomyelinase. *J Biol Chem* 1999; 274: 5267-70.

### Bruno Ségui

Rockefeller Building, 21 University Street, University College London, London WCE 6JJ, Royaume-Uni.

### Olivier Cuwillier

### Thierry Levade

Inserm U. 466, CHU Rangueil, 1, avenue Jean-Poulhès, 31403 Toulouse, France.

### Sabine Adam-Klages

Institut für Immunologie, Christian-Albrechts Universität zu Kiel, Kiel, Allemagne.

### Martin Krönke

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Universität zu Köln, Cologne, Allemagne.

## BRÈVES

■■■■ **L'obésité nutritionnelle vaincue par FOXC2.** La recherche intensive des cibles moléculaires pouvant contribuer à enrayer l'obésité et le diabète de type II, vient de révéler un nouvel acteur du métabolisme énergétique. Il s'agit de FOXC2, un facteur de transcription de type *winged-helix-forkhead* [1]. Plusieurs membres de cette famille sont homologues du gène DAF-16, maillon final d'une voie de signalisation similaire à celle de l'insuline chez *C elegans* [2]. Le fait que FOXC2 soit exprimé spécifiquement dans les adipocytes a conduit les auteurs à analyser sa fonction *in vivo* chez des souris transgéniques sur-exprimant le gène dans les tissus adipeux blanc et brun. Le phénotype obtenu associe diminution du poids du tissu adipeux blanc et augmentation de celui du tissu adipeux brun, sans modification de la prise alimentaire. Ceci s'accompagne d'une réduction des triglycérides et

des acides gras circulants, ainsi que de la glycémie et de l'insulinémie. En bon accord, les tests de tolérance au glucose indiquent une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les souris transgéniques, particulièrement sous régime riche en graisse. En outre, la diminution du rapport [gain de poids/prise alimentaire] démontre que l'efficacité métabolique de la nourriture est diminuée. Ainsi, le facteur FOXC2 peut être considéré comme un gène de « dépense », à l'opposé des gènes « d'économie » (*thriftly genes* pour les Anglo-Saxons). Une analyse du profil d'expression génique révèle que la sur-expression de FOXC2 induit celle de la protéine découplante UCP1 [3] et du co-activateur PGC1, impliqué dans la fonction et la biogenèse mitochondriale (*m/s 2000*, n° 6-7, p. 832). Cela se traduit par une augmentation du nombre des mitochondries et de la consommation

en oxygène du tissu adipeux. De plus, FOXC2 entraîne une sensibilité accrue aux stimulus adrénérgiques lipolytiques, en augmentant l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénérgiques et la sensibilité de la PKA à l'AMPc. Fait particulièrement intéressant, FOXC2 est induit par le régime gras et pourrait donc, physiologiquement, favoriser la résistance à l'obésité nutritionnelle en dissipant l'excès d'énergie ingérée. Ce système serait-il déficient chez certains individus ? Comment l'activer ou le réactiver ? Autant de points qui ne resteront certainement pas longtemps sans réponse, si toutefois FOXC2 s'exprime aussi dans le tissu adipeux humain.

[1. Cederberg A, *et al.* *Cell* 2001; 106 : 563-73.]

[2. Habeos I, *et al.* *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 139-40.]

[3. Ricquier D, *et al.* *Med Sci* 1997; 14: 889-97.]