

Implication de la voie de la LEI/L-DNase II dans un modèle de dégénérescence rétinienne induite par la lumière

Involvement of LEI/L-DNase II pathway in light-induced retinal degeneration

Par Sabine CHAHORY⁽¹⁾⁽²⁾, Yves COURTOIS⁽¹⁾, Alicia TORRIGLIA⁽¹⁾
(communication présentée le 22 janvier 2004)

RÉSUMÉ

Les dégénérescences rétiniennes, cause majeure de cécité chez les personnes âgées de plus de 50 ans dans les pays industrialisés, se traduisent par une perte des photorécepteurs. Malgré des origines diverses (génétiques, oxydatives), ces affections présentent un mécanisme physiopathologique commun : la mort par **apoptose** des photorécepteurs. L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée qui aboutit à la dégradation de l'ADN nucléaire. Deux types de voies moléculaires de l'apoptose sont actuellement reconnus : la **voie des caspases**, protéases à cystéine, qui est impliquée dans de nombreux modèles d'apoptose et les **voies indépendantes des caspases** qui mettent en jeu différentes protéines impliquées dans l'apoptose.

Notre travail consiste à étudier une voie indépendante des caspases, la voie de la **LEI (Leucocyte Elastase Inhibitor)/L-DNase II** dans un modèle de dégénérescence rétinienne induite par la lumière, modèle d'apoptose pour lequel les caspases ne sont pas activées. Sous l'effet de certains inducteurs de l'apoptose, la LEI, protéine cytoplasmique à activité anti-protéase, subit une modification post-traductionnelle et une nucléarisation: elle se transforme en L-DNase II, protéine nucléaire à activité endonucléase. Les résultats d'études immunohistochimiques et d'immunoblot, corrélés à la mesure de l'activité endonucléase dans les extraits de rétine des rats soumis à une illumination continue montrent l'implication de la voie de la LEI/L-DNase II dans ce modèle de dégénérescence rétinienne. Des travaux sont en cours pour déterminer l'importance de cette voie dans la mort des photorécepteurs et pour définir des protéines partenaires capables d'activer la LEI en L-DNase II dans ce modèle d'apoptose.

Mots-clés : apoptose, dégénérescence rétinienne induite par la lumière, endonucléase, L-DNase II, rétine, serpine.

(1) Physiopathologie des maladies oculaires : innovations thérapeutiques, INSERM U 598, Institut biomédical des Cordeliers, 15 rue de l'École de Médecine, 75006 Paris.

(2) Service d'ophtalmologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort.

SUMMARY

Retinal degenerations, a major cause of visual loss in people over 50 years old in industrialized countries, are characterized by the death of photoreceptors. Although they have various origins (genetic, oxidative), these diseases share a common physiopathological mechanism, i.e. death by apoptosis of the photoreceptors. Apoptosis is a programmed cell death mechanism, which results in the destruction of nuclear DNA. Two molecular pathways of apoptosis are known to date: the caspase-dependent pathway, involved in numerous apoptosis models, and caspase-independent pathways, which activate proteases other than caspases. Caspases are intracellular cysteine proteases.

Our study focuses on a caspase-independent pathway: the LEI (Leukocyte Elastase Inhibitor)/L-DNase II pathway in a light-induced retinal degeneration model, a model of apoptosis which does not involve the activation of caspases. When subjected to certain apoptosis-inducing factors, LEI, a cytoplasmic protein with anti-protease activity, undergoes post-translational modification and nuclear translocation, producing L-DNase II, a nuclear protein with endonuclease activity.

Evidence of the involvement of the LEI/L-DNase II pathway in this model of retinal degeneration was provided by immunohistochemistry studies and immunoblot analyses, correlated to the endonuclease activity of rat retinal extracts exposed to continuous illumination. Further studies are currently under way, to determine the importance of this pathway in photoreceptor death, and to identify partner proteins able to activate LEI into L-DNase II in this model of apoptosis.

Key words: *apoptosis, light-induced retinal degeneration, endonuclease, L-DNase II, retina, serpin.*

• INTRODUCTION

Au cours du vieillissement, l'œil subit des modifications physiologiques et surtout pathologiques qui entraînent un déficit visuel pouvant évoluer jusqu'à la cécité. Parmi ces affections oculaires invalidantes, les dégénérescences rétinienne sont prépondérantes. En effet, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) représente actuellement la cause majeure de cécité chez les personnes de plus de 50 ans, dans les pays industrialisés. (EVANS, 2001) Les dégénérescences rétinienne se traduisent par une perte des cellules photoréceptrices qui aboutit au dysfonctionnement de la rétine. Cliniquement, les signes sont très variables, allant d'une simple gêne visuelle jusqu'à une cécité complète. Aucun traitement ne permet d'empêcher ou d'enrayer l'évolution de cette maladie.

Dans la plupart des modèles animaux, les dégénérescences rétinienne sont d'origine génétique. Nous pouvons citer comme exemple le rat RCS, que nous avons également étudié et qui présente une dégénérescence rétinienne due à une mutation du gène Merk. Un autre modèle est celui de la dégénérescence rétinienne induite par la lumière. Il est particulièrement intéressant puisqu'une forte exposition à la lumière empire les dégénérescences rétinienne génétiques.

L'étude de ces différents modèles a montré que, malgré des origines variées (génétique, oxydative...), ces affections présentent un mécanisme physiopathologique commun : la mort des photorécepteurs par apoptose. (FAUSER *et al.*, 2002). Ce mécanisme commun ouvre des perspectives fondamentales: essayer d'identifier les voies métaboliques qui aboutissent à la mort des photorécepteurs par apoptose et de les inhiber afin de retarder la dégénérescence.

Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose, qui ont permis de différencier ce mécanisme de celui de la nécrose, sont bien définies. Sous l'effet de divers stimuli inducteurs de l'apoptose, la cellule subit une condensation de sa chromatine et de son cytoplasme. La membrane cytoplasmique émet des bourgeonnements qui vont englober l'ADN dégradé et les organelles restés intacts. Le tout aboutit à la formation de corps apoptotiques qui vont être digérés par les macrophages et les cellules avoisinantes. L'absence de déversement de matériel intracellulaire à l'extérieur de la cellule empêche la réponse inflammatoire. (REME *et al.*, 1998) Dans le processus d'apoptose, l'étape finale est la dégradation de l'ADN nucléaire par des endonucléases. Malgré de nombreux travaux, les voies métaboliques qui conduisent à la dégradation de l'ADN ne sont pas clairement établies. Actuellement, on distingue deux types de voies : la voie des caspases apparaît comme la voie majeure de l'apoptose, avec le rôle central des caspases 3 et 7. (KAUFMANN et HENGARTNER, 2001) Ces enzymes peuvent être activées selon deux voies : la voie de proximité, qui fait intervenir les protéines Fas et TNF et la voie mitochondriale qui implique la libération du cytochrome c. L'activation des caspases 3 et 7 aboutit au clivage de la protéine ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) et ainsi à la libération de la protéine CAD responsable au final de la dégradation de l'ADN nucléaire. La figure 1 illustre la cascade enzymatique de cette voie. (TORRIGLIA *et al.*, 2000)

Alors que l'importance de la voie des caspases dans l'apoptose est clairement établie, différents travaux ont mis en évidence plusieurs voies dites **indépendantes des caspases** impliquées dans l'apoptose. Ces voies font intervenir différentes protéines résumées dans la **figure 1** : bax, AIF (Apoptosis Inducing Factor), les cathepsines, les calpaïnes, les granzymes, le protéasome, les protéases à sérine. (COUNIS et TORRIGLIA, 2000 ; TORRIGLIA *et al.*, 2000) Notre travail porte sur l'une de ces voies : la LEI (Leucocyte Elastase Inhibitor)/L-DNase II.

L'activation de la L-DNase II a été mise en évidence pour la première fois lors de la différenciation terminale des cellules cristalliniennes, dont le mécanisme est très proche de celui de l'apoptose. (TORRIGLIA *et al.*, 1995). Par la suite, cette enzyme a été impliquée dans plusieurs modèles d'apoptose : dans les cellules rétinienne de l'embryon de Poulet (TORRIGLIA *et al.*, 2001), dans les cellules HeLa humaines (TORRIGLIA *et al.*, 1999), dans les cellules murines L1210 traitées à la staurosporine (BELMOKHTAR *et al.*, 2000).

Des études *in vitro* ont montré que la L-DNase II dérive de la LEI par modification post-traductionnelle. (TORRIGLIA *et al.*, 2000) La LEI appartient à la super-famille des serpinés (inhibiteurs des protéases à sérine). Dans sa forme native, la LEI a une localisation cytoplasmique et possède une activité antiprotéase. Elle inhibe, notamment, l'élastase, la cathepsine G et la protéinase 3 (COOLEY *et al.*, 2001). Sous l'effet de certains facteurs (exposition à un pH acide, activation par l'élastase), la LEI subit une modification structurale qui aboutit à une

perte de poids moléculaire et à un changement de localisation et de fonctionnalité. Elle perd son activité anti-protéase et acquiert une activité endonucléase. (TORRIGLIA *et al.*, 2003) (**figure 2**).

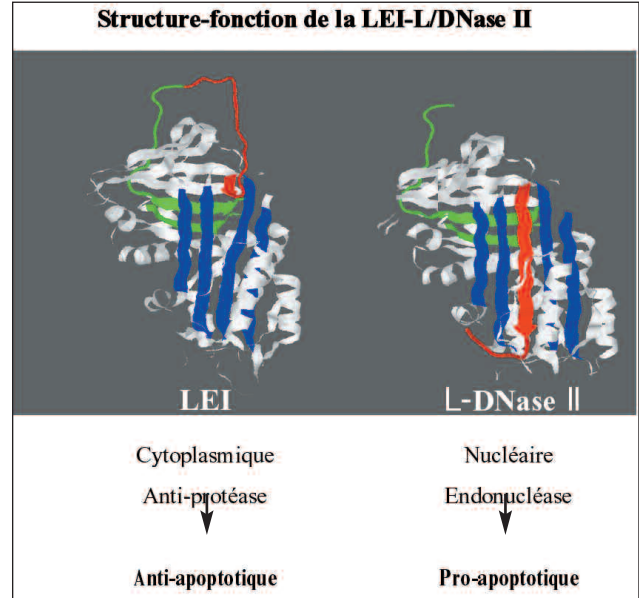


Figure 2 : Structure-fonction de la LEI/L-DNase II : dans sa forme native, la LEI (Leucocyte Elastase Inhibitor) a une localisation cytoplasmique et possède une activité antiprotéase. Sous l'effet de certains facteurs inducteurs de l'apoptose, la LEI subit une transformation post-traductionnelle qui aboutit à une perte de poids moléculaire et à un changement de localisation et de fonctionnalité. Elle perd son activité anti-protéase et acquiert une activité endonucléase (TORRIGLIA, 2000).

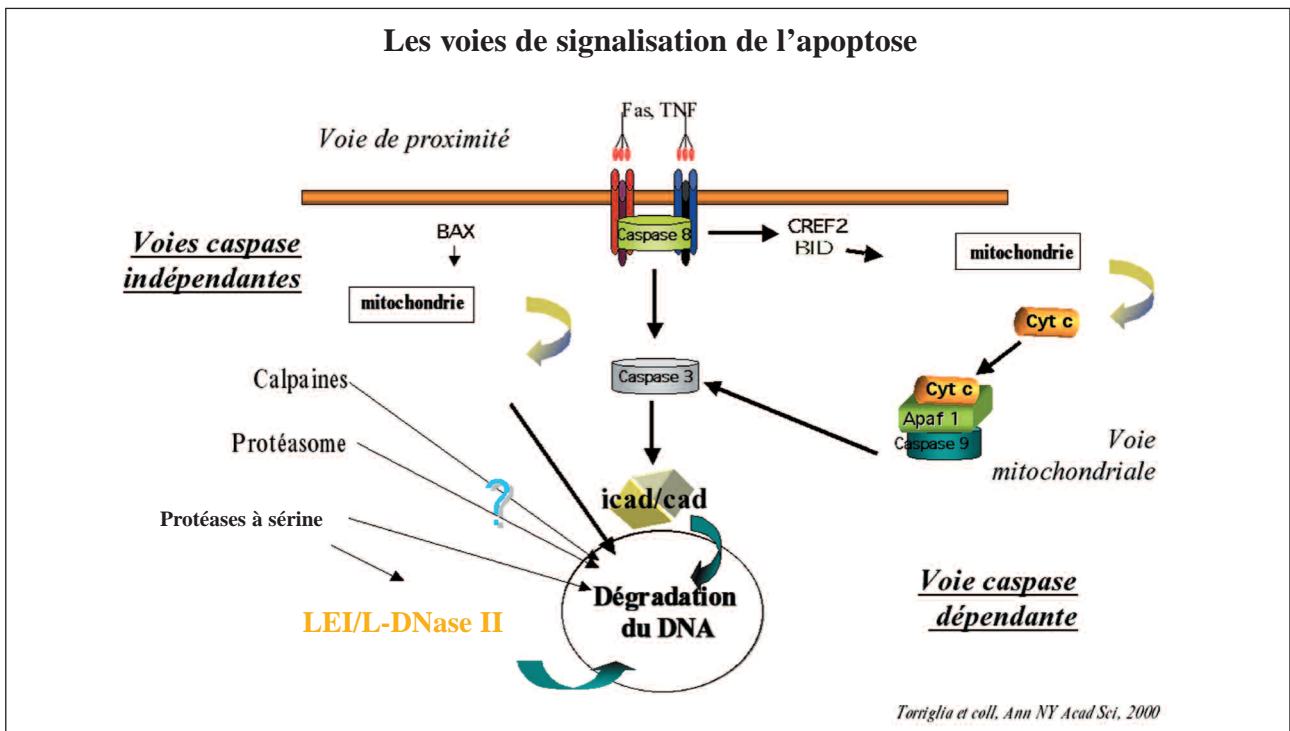


Figure 1 : Les voies métaboliques de l'apoptose : la voie des caspases, avec le rôle central des caspases 3 et 7, est la voie majeure de l'apoptose. Mais de nombreux modèles d'apoptose, dits indépendants des caspases, font intervenir d'autres protéines, dont les interactions ne sont pas encore bien élucidées. La LEI/L-DNase II est une de ces voies indépendantes des caspases.

Bien que la voie des caspases apparaisse comme une voie majeure du mécanisme d'apoptose, des travaux récents ont montré que cette voie n'est pas impliquée dans la dégénérescence rétinienne induite par la lumière. (DONOVAN *et al.*, 2001). Il nous a donc paru intéressant de rechercher si la voie de la LEI était impliquée dans ce modèle.

• PREMIERS RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Mise en évidence de la voie de la LEI/L-DNase II dans les extraits de rétine de rats Fischer surexposés à la lumière.

Des coupes de rétine de rats Fischer non illuminés et de rats ayant subi respectivement une illumination continue de 1, 2, 5 et 9 jours ont été soumises à l'anticorps anti-L-DNase II et à une contre-coloration DAPI. L'observation des couches nucléaires en fonction du temps d'exposition à la lumière montre la dégénérescence progressive de la neurorétine entre un et neuf jours d'illumination. La couche nucléaire externe, qui correspond aux noyaux des photorécepteurs, est la plus atteinte. La coloration DAPI montre un amincissement de la couche nucléaire externe chez les rats soumis à 2 et 5 jours d'illumination. Chez les rats soumis à 9 jours d'illumination, les couches nucléaires externe et interne ne sont plus dissociables. La neurorétine apparaît complètement dégénérée. Sur les coupes révélant le marquage de l'anticorps anti-L-DNase II, celui-ci semble changer de localisation pour se concentrer dans les noyaux à 2 et 5 jours d'illumination.

Afin d'établir si la translocation nucléaire de la fluorescence est spécifique de ce modèle, nous avons réalisé des coupes similaires chez les rats RCS à différents temps de la maladie (à 5, 10, 15, 25, 35 et 60 jours après la naissance) et sur des rétines de rats RCS témoins. A la différence de la dégénérescence induite par la lumière, les caspases ont été impliquées dans ce modèle de dégénérescence (KATAI, 1999). Les coupes en coloration DAPI nous permettent de suivre l'évolution de la maladie. Les deux couches nucléaires externe et interne sont bien distinctes à partir de 10 jours. Aucune différence n'apparaît à ce stade entre les rats témoins et les rats dystrophiques. A 25 jours, la couche nucléaire externe des rats dystrophiques est amincie par rapport à celle des rats témoins. La différence est encore plus marquée à 35 jours. A 60 jours, la couche nucléaire externe des rats dystrophiques a quasiment disparu, ce qui correspond au stade final de la dégénérescence rétinienne des rats RCS. Les mêmes coupes ont été marquées avec l'anticorps anti-L-DNase II. Aucune différence du marquage de l'anti-L-DNase II n'est mise en évidence entre les différents stades de la dégénérescence rétinienne, ni entre les rats dystrophiques et les rats témoins.

Mise en évidence d'une activité endonucléase dans les extraits de rétine de rats Fischer surexposés à la lumière.

L'activité endonucléase des extraits totaux de rétine de rats exposés à la lumière a été mesurée en utilisant comme substrat un plasmide surencroulé. L'activité DNase a été évaluée en analysant, après incubation avec l'extrait, l'état du plasmide sur un gel d'agarose contenant du BET. On constate une dégradation du plasmide qui augmente légèrement chez les rats soumis à 2 jours d'illumination : au bout de 150 minutes d'incubation, la dégradation du plasmide est plus forte chez ceux-ci qu'aux stades précédents (non illuminés et 1 jour d'illumination). Chez les rats soumis à 5 jours d'illumination, une dégradation comparable du plasmide est obtenue au bout de 60 minutes d'incubation seulement.

Cette augmentation de l'activité correspond-elle à une néosynthèse ou à une transformation de l'enzyme préexistante ?

Nous avons étudié par Western Blot des extraits de rétine identiques à ceux étudiés précédemment. Les immunoblots réalisés sur des extraits totaux de rétine ne révèlent aucune augmentation de la synthèse de LEI, indiquant que ce facteur n'intervient pas dans l'augmentation de l'activité constatée. Un fractionnement cellulaire a donc été réalisé pour analyser les protéines nucléaires. Les immunoblots réalisés à partir de ces extraits révèlent une nette augmentation de la L-DNase II à 2 jours d'illumination.

Étude des voies enzymatiques capables d'activer la LEI

Les résultats précédents ont confirmé que la voie de la LEI/L-DNase II est impliquée dans notre modèle de dégénérescence rétinienne induite par la lumière. Des travaux antérieurs menés dans notre laboratoire ont montré que la LEI pouvait être activée par l'élastase et les cathepsines, notamment les cathepsines D et G. Nous avons donc recherché si l'activité de ces enzymes était modifiée dans notre modèle de dégénérescence rétinienne. L'activité enzymatique de l'élastase et des cathepsines B, C, G et L, a été mesurée par une méthode colorimétrique dans les extraits de rétines de rats Fischer non illuminés et soumis à 1, 2 et 5 jours d'illumination. Notre méthode n'a pas permis de mettre en évidence des variations d'activité pour l'élastase et les cathepsines B, C, G et L en fonction du temps d'exposition à la lumière. En revanche, l'activité de la cathepsine D augmente en fonction du temps d'exposition.

Interaction des calpaïnes I et II avec la LEI :

Des travaux récents ont montré l'implication des calpaïnes I et II dans un modèle de dégénérescence rétinienne induite par la lumière (DONOVAN et COTTER, 2002). Nous avons donc recherché si les calpaïnes étaient capables d'activer la LEI. A cet effet nous avons synthétisé de la LEI radio-marquée par transcription-traduction *in vitro* et nous l'avons incubée avec les calpaïnes pour rechercher une éventuelle interaction entre les calpaïnes I et II et la LEI. L'analyse de cette interaction par autoradiographie après séparation sur un gel d'acrylamide ne montre pas de clivage de la LEI induite par les calpaïnes, ni la formation de complexe, ce qui suggère que les calpaïnes n'activent pas directement la LEI.

• CONCLUSION

Nos travaux ont montré que la voie de la LEI/L-DNase II est impliquée dans notre modèle de dégénérescence rétinienne induite par la lumière. Ceci est attesté par une augmentation de l'activité de cette enzyme au cours de la dégénérescence et visualisé par sa translocation nucléaire. Dans ce modèle, la transformation de la LEI en L-DNase II est vraisemblablement catalysée par une protéase à sérine de la famille des cathepsines. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

REMERCIEMENTS

Ce travail est mené grâce au soutien de Rétina France.

BIBLIOGRAPHIE

- BELMOKHTAR CA, TORRIGLIA A, COUNIS MF, COURTOIS Y, JACQUEMIN-SABLON A, SÉGAL-BENDIRDJIAN E (2000) Nuclear translocation of a Leucocyte Elastase Inhibitor/ Elastase complex during Staurosporine-induced apoptosis : role in the generation of nuclear L-DNase II activity. *Experimental Cell Research*, **254**, 99-109.
- COOLEY J, TAKAYAMA TK, SHAPIRO SD, SCHECHTER NM, REMOLD-O'DONNELL E (2001) The Serpin MNEI Inhibits Elastase-like and Chymotrypsin-like Serine Proteases through Efficient Reactions at Two Active Sites. *Biochemistry*, **40**, 15762-15770.
- COUNIS MF, TORRIGLIA A (2000) DNases and apoptosis *Biochem. Cell Biol.*, **78**, 405-414.
- DONOVAN M, CARMODY RJ, COTTER TG (2001) Light-induced photoreceptor apoptosis in vivo requires neuronal nitric-oxide synthase and guanylate cyclase activity and is caspase-3-independent. *J. Biol. Chem.*, **276**, 23000-23008.
- DONOVAN M, COTTER TG (2002) Caspase-independent photoreceptor apoptosis in vivo and differential expression of apoptotic protease activating factor-1 and caspase-3 during retinal development. *Cell Death and Differentiation*, **9**, 1220-1231.
- EVANS JR (2001) Risk factors for Age-related Macular degeneration. *Prog. Ret. Eye Res.*, **20**, 227-253.
- FAUSER S, LUBERICHS J, SCHUTTAUF F (2002) Genetic animal models for retinal degeneration. *Surv. Ophthalmol.*, **47**, 357-367.
- KATAI N, KIKUCHI T, SHIBUKI H, KUROIWA S, ARAI J, KUROKAWA T, YOSHIMURA N (1999) Caspase-like proteases activated in apoptotic photoreceptors of Royal College Surgeon Rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **40**, 1802-1807.
- KAUFMANN SH, HENGARTNER MO (2001) Programmed cell death : alive and well in the new millennium. *TRENDS in Cell Biology*, **1**, 526-534.
- REME C, GRIMM C, HAFEZI F, MARTI A, WENZEL A (1998) Apoptotic Cell Death in Retinal Degenerations. *Prog. Ret. Eye Res.*, **17**, 443-464.
- TORRIGLIA A, CHAUDUN E, CHANY-FOURNIER F, JEANNY JC, COURTOIS Y, COUNIS MF (1995) Involvement of DNase II in nuclear degeneration during lens cell differentiation. *J. Biol. Chem.*, **270**, 28579-28585.
- TORRIGLIA A, NEGRI C, CHAUDUN E, PROSPERI E, COURTOIS Y, COUNIS MF, IVANA SCOVASSI A (1999) Differential involvement of DNases in HeLa cell apoptosis induced by etoposide and log-term culture *Cell Death and Differentiation* **6**, 234-244.
- TORRIGLIA A, PERANI P, BROSSAS JY, ALTAIRAC S, ZEGGAI S, MARTIN E, TRETON J, COURTOIS Y, COUNIS MF (2000) A Caspase-Independent Cell Clearance Program. The LEI/L-DNase II Pathway. *Ann. NY Acad. Sci.*, **926**, 192-203.
- TORRIGLIA A, CHAUDUN E, CHANY-FOURNIER F, COURTOIS Y, COUNIS MF (2001) Involvement of L-DNase II in nuclear degeneration during chick retina development *Exp. Eye Res.*, **72**, 443-453.
- TORRIGLIA A (2003) Molecular basis of the transformation of LEI into L-DNase II during apoptosis. *Recent Res. Devel. Mol. Cell. Biol.*, **4**, 23-38.