

**Université de Montréal**

**RÔLE ET FONCTION DES CASPASES  
LORS DE L'APOPTOSE INDUITE  
PAR LA CHIMIOTHÉRAPIE**

**Par**

**Alain Théophile Sané**

**PROGRAMME DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

**Faculté des études supérieures**

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en biologie moléculaire**

**août, 1999**

**© Alain Théophile Sané, 1999**



**Université de Montréal**

**Faculté des études supérieures**

**Cette thèse intitulée:**

**RÔLE ET FONCTION DES CASPASES  
LORS DE L'APOPTOSE INDUITE  
PAR LA CHIMIOTHÉRAPIE**

**Présentée par:  
Alain Théophile Sané**

**a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:**

Yves Raymond, président-rapporteur  
Richard Bertrand, directeur de recherche  
Edward Bradley, membre du jury  
Girish Shah, examinateur externe  
Richard L. Momparler, représentant du doyen

**Thèse acceptée le:.....30 août 1999.....**

## SOMMAIRE

La chimiothérapie des cancers induit dans les cellules une cascade d'événements biochimiques qui culminent dans la mort cellulaire par apoptose caractérisée par une fragmentation extensive de l'ADN.

Il s'agissait pour nous de définir le rôle et la fonction des cystéine protéases (caspases) dans la fragmentation apoptotique de l'ADN suite au traitement des cellules humaines Namalwa et U-937 avec l'inhibiteur de la topoisomérase 1 (top1), la camptothécine (CPT), dont plusieurs analogues sont actuellement utilisés en clinique.

Dans un premier temps nous avons cherché à montrer, dans les extraits cytosoliques des cellules traitées avec la CPT, la présence d'activités promotrices de la fragmentation de l'ADN. Nos résultats ont démontré que de tels extraits induisent la fragmentation de petit poids moléculaire de l'ADN en présence de noyaux isolés.

Nous avons, par la suite, caractérisé davantage les composés actifs contenus dans les extraits cytosoliques et démontré la présence de protéases dont les inhibiteurs bloquent la fragmentation de l'ADN. En l'occurrence, l'utilisation de

l'inhibiteur tripeptidique des caspases, la benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(Ome)fluoromethyl ketone (z-VAD-fmk), nous a permis de démontrer *in vivo* et *in vitro* que les caspases activées sont plus directement impliquées dans l'activation de la fragmentation de haut poids moléculaire de l'ADN et que l'activité sensible à la N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethylketone (TPCK) et au CrmA (cytokine response modifier A) est impliquée dans l'activation de la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN après traitement des cellules avec la CPT.

Enfin, nous avons étudié la destinée des cellules traitées avec la CPT suite à l'inhibition des caspases et démontré que cette inhibition des caspases bloque l'apoptose, retarde le passage des cellules en phase S/G<sub>2</sub> du cycle cellulaire et provoque un arrêt transitoire en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> suivi d'une mort par nécrose. Il apparaît donc que suite à un traitement des cellules avec la CPT, les voies d'initiation de l'apoptose et de la nécrose sont similaires mais diffèrent dans la présence de caspases actives.



**TABLE DES MATIÈRES**

SOMMAIRE .....	i
TABLE DES MATIÈRES .....	iii
LISTE DES FIGURES .....	vii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	x
REMERCIEMENTS .....	xv
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION.....	1
1.1 La chimiothérapie .....	1
1.2 L'apoptose et le cancer .....	1
1.2.1 Les voies p53-dépendantes et -indépendantes .....	2
1.2.1.1 La voie p53-dépendante .....	3
1.2.1.2 La voie p53-indépendante .....	9
1.2.2 Les points de contrôle du cycle cellulaire .....	10
1.3 L'apoptose.....	15
1.3.1 Définition.....	15
1.3.2 Historique.....	16
1.4 La fragmentation de l'ADN durant l'apoptose.....	20
1.5 La nécrose.....	21
1.6 Activation de l'apoptose .....	22
1.6.1 Les topoisomérases d'ADN.....	23
1.6.2 Les inhibiteurs des topoisomérases.....	26

1.6.3 Cytotoxicité des inhibiteurs des topoisomérases .....	29
1.6.4 Inhibiteurs des topoisomérases et apoptose.....	34
1.7 Les protéases de l'apoptose.....	36
1.7.1 Les caspases.....	37
1.7.2 Voies d'activation des caspases .....	41
1.7.3 Les sérines protéases .....	50
1.8 Activation des endonucléases dans l'apoptose.....	53
1.9 Objectifs du projet .....	58
CHAPITRE 2 - RÉSULTATS .....	60
2.1 The CrmA- and TPCK-sensitive pathways that trigger the oligonucleosome-sized DNA fragmentation in camptothecin-induced apoptosis; relation to caspase activation and high molecular weight DNA fragmentation ( <u>Biochem. Cell Biol.</u> 75: 359-368, 1997). .....	60
Abstract.....	61
Résumé .....	63
Introduction.....	65
Materials and Methods .....	68
Results.....	74
Discussion.....	80
Références.....	85
Figure legends .....	99

2.2 Distinct steps in DNA fragmentation pathway during camptothecin-induced apoptosis involved caspase, benzyloxycarbonyl- and N-tosyl-L-phenylalanylchloromethyl ketone- sensitive activities ( <u>Cancer Research</u> 58 : 3066-3072, 1998) .....	107
Abstract.....	108
Introduction.....	111
Materials and Methods .....	112
Results.....	118
Discussion.....	126
References.....	131
Figure legends .....	141
2.3 Caspase inhibition in camptothecin-treated U-937 cells is coupled with a shift from apoptosis to transient G <sub>1</sub> arrest followed by necrotic cell death (in press, <u>Cancer Research</u> 59, 1999) .....	152
Abstract.....	154
Introduction.....	155
Materials and Methods .....	156
Results and Discussion .....	161
References.....	167
Figure legends .....	173
CHAPITRE 3 - DISCUSSION .....	180
3. 1 Mode d'action et cytotoxicité de la camptothécine .....	182

3.2 Effets du CrmA, de la TPCK et de la zVAD-fmk dans les fragmentations oligonucléosomique et de haut poids moléculaire induites par la CPT.....	185
3.3 Activation des protéases durant l'apoptose.....	188
3.4 Cascades protéolytiques en aval des caspases.....	195
3.5 Effet de l'inhibition des protéases sur l'apoptose et le cycle cellulaire.....	197
3.6 Activation des endonucléases et fragmentation de l'ADN.....	201
3.7 Conclusions .....	209
3.8 Perspectives .....	210
ANNEXE : Activation and role of caspases in chemotherapy-induced apoptosis ( <u>Drug Resistance Updates</u> , 2: 21-29, 1999).....	212
BIBLIOGRAPHIE .....	213

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

Figure 1.1 : Préférences de bases aux sites de clivage pour les inhibiteurs de topoisomérases .....	28
Figure 1.2 : Modèle de dommage à l'ADN induit par la collision entre la fourche de réplication de l'ADN et les complexes de clivage stabilisés par la CPT .....	32
Figure 1.3 : La famille des caspases.....	39
Figure 1.4:Modèle d'activation protéolytique des caspases pendant l'apoptose.....	44

### CHAPITRE 2 - RÉSULTATS

2.1 The CrmA- and TPCK-sensitive pathways that trigger oligonucleosome-sized DNA fragmentation in camptothecin-induced apoptosis: relation to caspase activation and high molecular weight DNA fragmentation

Figure 1 : Kinetics of DNA fragmentation induced by CPT in control and CrmA-expressing Namalwa and U-937 cells .....	102
Figure 2 : Oligonucleosome-sized and high molecular weight DNA fragmentation induced by CPT in Namalwa cells .....	103
Figure 3 : Effect of TPCK on oligonucleosome-sized and high molecular weight DNA fragmentation induced by CPT in Namalwa and	

U-937 cells.....	104
Figure 4 : Detection of TPCK-sensitive activities in a cell-free system .....	105
Figure 5 : Caspase-3-like activities in CPT-treated cells.....	106
2.2 Distinct Steps in DNA Fragmentation Pathway during Camptothecin- induced Apoptosis Involved Caspase-, Benzyloxycarbonyl- and N-Tosyl-L- Phenylalanylchloromethyl Ketone-sensitive Activities	
Figure 1 : The effect of TPCK upon oligonucleosome-sized and high weight DNA fragmentation induced by CPT .....	145
Figure 2 : The effect of zVAD-fmk upon oligonucleosome-sized and high molecular weight DNA fragmentation induced by CPT .....	146
Figure 3 : The effect of TPCK and zVAD-fmk on caspase activities in CPT-treated U-937 .....	147
Figure 4 : The effect of TPCK and zVAD-fmk on cell proliferation and metabolic activity after CPT treatment .....	148
Figure 5 : The effects of TPCK and zVAD-fmk on cellular morphology after CPT treatment.....	149
Figure 6 : The effects of TPCK and zVAD-fmk on cell cycle progression after CPT treatment.....	150
Figure 7 : DEVDase and DNA fragmentation-promoting activities in cytosolic extracts obtained from CPT-treated U-937 cells .....	151

2.3 Caspase inhibition in camptothecin-treated U-937 cells is coupled with a shift from apoptosis to transient G1 arrest followed by necrotic cell death

Figure 1 : The effects of caspase inhibition in CPT-treated U-937 cells ..... 176

Figure 2 : The effects of caspase inhibition on cellular morphology in

CPT-treated U-937 cells..... 177

Figure 3 : The effects of zVAD-fmk on expression of cell cycle-related

proteins in CPT-treated U-937..... 178

Figure 4 : Kinetics of cyclin dependent kinase activities in CPT-treated

U-937 cells in the absence or presence of zVAD-fmk..... 179

**LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS**

Ac-DECD-CHO : Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO

Ac-DEVD-AMC : Ac-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-methylcoumarin

Ac-YVAD-CHO : Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-CHO

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AIF : Apoptosis inducing factor

ANT : Adenine nucleotide translocator

Apaf : Apoptotic protease activating factor

APC : Adenomatous polyposis coli

ARN : Acide ribonucléique

ATA : Aurintricarboxylic acid

ATM : Ataxia telangiectasia gene

Atr : Atractyloside

BID : BH3 interacting domain protein

Cad : Caspase-activated DNase

CAF : Caspase-activated Factor

CARD : Caspase recruitment domain

Cdk : Cyclin dependent kinase

Cdki : Cyclin dependent kinase inhibitor

CHO : Chinese hamster ovary



Ci : Curie

Cpan : Caspase-activated nuclease

CPT : Camptothécine

CrmA : Cytokine response modifier A

DABCYL-YVADAPV-EDANS : 4-(4-dimethyl-aminophenylazo)benzoyl-Tyr-Val-Asp-Ala-Pro-Val-5-((2-aminoethyl)amino)-naphthalene-1sulfonic acid

dATP : Deoxy adenosine-tri-phosphate

DCI : Dichloroisocoumarin

DD : Death domain

DED : Death effector domain

DEVDase : Asp-Glu-Val-Asp-ase

DEVD-CHO : Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde

Dff : DNA fragmentation factor

DFP : Diisopropyl fluorophosphate

DISC : Death-inducing signaling complex

DNA : Deoxyribonucleic acid

DNA-PK : DNA-dependent protein kinase

EDTA : Ethylenediamine-tetraacetic acid

ESMD-MCA : Ac-Glu-Ser-Met-Asp-MCA

FADD : Fass-associated protein with death domain

FasL : Fas ligand

FASR : CD95/Fas receptor

FLICE : FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme

FLIP : FLICE-like inhibitory protein

G<sub>1</sub> : Gap phase 1

G<sub>2</sub> : Gap phase 2

G<sub>0</sub> : Gap phase 0

h : hour

IAP : Inhibitor of apoptosis

Icad : Inhibitor of Caspase-activated DNase

ICE : Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme

INK4 : Inhibitors of Cdk4

IRF-1 : Interferon regulatory factor 1

kDa : Kilodalton

kpb : Kilo paire de bases

kV : Kilovolt

MORT-1 : Mediator of receptor-induced toxicity 1

MPF : Maturation promoting factor

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NGF : Nerve growth factor

NK : Natural killer

PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase

pb : Paire de bases

PBS : Phosphate buffered saline

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen

PI-9 : Proteinase inhibitor 9

PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride

RICK : RIP-like interaction CLARP kinase

SCID : Severe combined immunodeficiency

TAFE : Transverse alternating field electrophoresis

TAPFE : Transverse alternating pulsed field electrophoresis

TGF- $\beta$  : Tumor growth factor beta

TLCK : N-tosyl -L-lysyl chloromethyl ketone

TNF : Tumor necrosis factor

TNFR : Tumor necrosis factor receptor

Top1 : Topoisomérase de type 1

Top2 : Topoisomérase de type 2

TPCK : N-tosyl -L-phenylalanyl chloromethyl ketone

TRADD : TNFR-associated death domain protein

TRAF : Tumor necrosis factor receptor-associated factor

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand

U : Unit

UV : Radiations ultraviolettes

z : Benzyloxycarbonyl

z-NHNH<sub>2</sub> : Benzyloxycarbonyl hydrazide

zVAD-COOH : Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-free carboxyl group

z-VAD-fmk : Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(Ome)fluoromethyl

zVA-OH : Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-free hydroxyl group

zV-OH : Benzyloxycarbonyl-Val-free hydroxyl group

## REMERCIEMENTS

Le Docteur Richard Bertrand voudra bien trouver ici l'expression de mes sentiments de profonde gratitude pour l'occasion qu'il m'a donnée de poursuivre mes études doctorales dans son laboratoire. Je voudrais, en particulier, souligner son attention, son ouverture, son écoute et sa présence effective pendant toutes les étapes de réalisation de ce projet de recherche. Par ailleurs je veux souligner ici la qualité pédagogique exceptionnelle qu'il a apportée dans la supervision de mes travaux.

À ma collègue Estelle Schmitt qui m'a apporté ses encouragements mais aussi ses conseils pendant ses trois années, j'offre ma sincère reconnaissance.

À ces remerciements sont associés l'Institut du cancer de Montréal pour les espaces et la disponibilité des équipements de recherche, les organismes subventionnaires tels le Conseil de recherches médicales du Canada, Canderel et la Faculté des Études Supérieures pour leurs fonds et bourses qui ont permis de mener mon projet de recherche.

Enfin je dis toute ma reconnaissance à mes parents, frères et amis qui ont toujours cru en ce qui me passionnait dans la recherche.

## CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

### 1.1 La chimiothérapie

La génotoxicité de beaucoup de drogues utilisées en chimiothérapie des cancers est due à leur capacité d'interrompre le métabolisme de l'ADN et, à des doses thérapeutiques, d'induire l'apoptose dans les cellules cibles. Il y a des évidences qu'une des voies vers la carcinogénèse, après un dommage à l'ADN, est l'incapacité à activer l'apoptose (Griffiths *et al.*, 1997; Lowe *et al.*, 1994b). On comprend dès lors l'importance de définir les événements biochimiques par lesquels la chimiothérapie induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses. Une meilleure compréhension de ces événements va aider à proposer de nouvelles stratégies pour la thérapie des cancers.

### 1.2 L'apoptose et le cancer

La résistance à l'apoptose est une caractéristique fréquente des cellules cancéreuses et participe à la fois à la phase initiale de la carcinogénèse et au développement de la résistance à la chimiothérapie. Le gène de la p53 est celui qui est le plus souvent muté dans les cancers humains et il est dérégulé dans un grand nombre de tumeurs (Harris & Hollstein, 1993; Hollstein *et al.*, 1991). En règle générale, le traitement conventionnel des cancers induit l'apoptose dans les cellules malignes et les gènes qui régulent l'apoptose influencent la réponse

des cellules cancéreuses à la chimiothérapie (Decaudin *et al.*, 1998). Si l'apoptose se produit suite à un dommage à l'ADN, alors on doit s'attendre à ce que l'état de la p53 dans les cellules cancéreuses modifie l'effet de ces drogues (Lowe *et al.*, 1993; 1994a). Deux scénarios sont envisageables dans ce contexte. D'abord, dans les cellules qui entrent en apoptose p53-dépendante suite à un dommage à l'ADN, le non-fonctionnement de la p53 peut permettre la survie et, par conséquent, la résistance au traitement. En fait, les cellules survivantes peuvent avoir acquis davantage de mutations lors du traitement et se comporter plus agressivement. Cependant, dans d'autres tissus, l'apoptose peut ne pas être la conséquence de l'action de la p53 et dans certains types cellulaires, la p53 peut être partiellement ou entièrement redondante par rapport à des voies qui dépendent d'autres gènes (Lowe *et al.*, 1993; 1994a). Les lignées cellulaires Namalwa et U-937 que nous avons utilisées dans cette étude n'expriment pas la p53 et constituent donc un modèle de choix pour étudier l'apoptose p53-indépendante.

### **1.2.1 Les voies p53-dépendantes et -indépendantes**

La p53 est un facteur de transcription qui est induit dans les cellules comportant des dommages à l'ADN causés par des radiations ionisantes ou d'autres traitements (Elledge & Lee, 1995; Harris, 1996; King & Cidlowski, 1998; Sanchez & Elledge, 1995). La p53 humaine comprend 393 acides aminés qui

forment trois domaines fonctionnels: un domaine N-terminal acide de transactivation, un domaine central de liaison à l'ADN et un domaine C-terminal d'homo-oligomérisation. Tous ces domaines sont nécessaires à la liaison efficace de la p53 aux sites de reconnaissance des gènes cibles et à l'activation transcriptionnelle de ces gènes (Oren, 1997).

#### 1.2.1.1 La voie p53-dépendante

L'apoptose liée à la p53 est causée par les dommages à l'ADN, l'activation inappropriée d'oncogènes, la carence en facteurs de croissance, l'hypoxie et le choc thermique (Canman *et al.*, 1995; Eizenberg *et al.*, 1995; 1996; Graeber *et al.*, 1996). L'activation de la p53 en réponse à un dommage à l'ADN induit un arrêt en G<sub>1</sub> ou en G<sub>2</sub> qui conduit à la réparation et au rétablissement de l'intégrité homéostatique ou à l'apoptose.

Dans plusieurs types cellulaires, les dommages à l'ADN sont couplés avec la stabilisation et l'accumulation de la p53. Ainsi la p53 semble jouer un rôle capital dans l'apoptose induite par les dommages à l'ADN chez les thymocytes corticaux (Clarke *et al.*, 1993), les promyélocytes (Lotem & Sachs, 1993), les lymphocytes B et T périphériques (Strasser *et al.*, 1994), les neurones (Wood & Youle, 1995), les kératinocytes (Ziegler *et al.*, 1994) et les cellules épithéliales de l'intestin (Clarke *et al.*, 1994). L'altération génétique commune la plus



observée dans les cancers, la mutation du gène de la p53, inactive un point de contrôle de la transition G<sub>1</sub>/S (Kastan *et al.*, 1991). Les cellules qui ont perdu la fonction de la p53 présentent une instabilité génétique et une extension de leur espérance proliférative (White, 1994). La p53 se lie préférentiellement aux sites de lésion de l'ADN et active la transcription de ses gènes cibles par des interactions avec des motifs spécifiques et ces interactions sont sélectivement régulées par les changements de niveau de phosphorylation de la p53 (Hecker *et al.*, 1996). La liaison de la p53 par des protéines régulatrices endogènes peut aussi réguler sa fonction. Par exemple, le produit du gène *WT1* inhibe l'apoptose p53-dépendante sans affecter l'arrêt du cycle cellulaire induit par la p53 (Maheswaran *et al.*, 1995). Les cellules avec une seule copie fonctionnelle du gène de la p53 ont des taux d'apoptose intermédiaires suggérant un seuil d'induction de l'apoptose qui se situe à un niveau d'activité maximale de la p53 physiologique (Attardi *et al.*, 1996). *In vitro*, il semble que la p53 induise l'apoptose par divers mécanismes. Un de ces mécanismes implique l'activation de BAX, un membre de la famille des BCL-2 qui induit l'apoptose quand il est en excès par rapport à BCL-2. Cependant, Bax n'est pas indispensable à l'apoptose p53-dépendante dans les thymocytes irradiés par des rayons  $\gamma$  (Knudson *et al.*, 1995), suggérant que d'autres facteurs sont encore plus importants. La répression transcriptionnelle de *BCL-2* par la p53 peut aussi contribuer à l'apoptose (Selvakumaran *et al.*, 1994). D'autres membres de la famille de BCL-2 tel BCL-xL peuvent inhiber, *in vitro*, l'apoptose p53-

dépendante (Schott *et al.*, 1995). Une fois que l'apoptose p-53 dépendante est induite, il n'y a aucune évidence qu'elle diffère de l'apoptose induite par d'autres moyens (Knudson & Korsmeyer, 1997; Knudson *et al.*, 1995). Récemment, une série de gènes cibles de la p53 ont été identifiés qui semblent jouer un rôle dans l'apoptose p53-dépendante. Le rôle et la fonction de ces gènes dénommés PIGs "*p53 inducible genes*" restent, cependant, à être élucidés (Polyak *et al.*, 1997).

La p53 peut induire l'arrêt de la croissance à certaines étapes du cycle cellulaire dont le mieux compris est l'arrêt en phase G<sub>1</sub> tardive. Comme gène suppresseur de tumeurs, la p53 est mutée dans presque la moitié des cancers humains et le point de contrôle de la phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire dépend en partie de son activité (Kastan *et al.*, 1991). La majorité des mutations de la p53 observées chez les cellules cancéreuses sont concentrées dans le domaine de liaison à l'ADN (O'Connor *et al.*, 1997). La p53 induit l'arrêt en G<sub>1</sub> à travers une activation transcriptionnelle spécifique de la p21 (Brugarolas *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 1995). La p53 initie la synthèse de la p21 (Chen *et al.*, 1996; King & Cidlowski, 1998) et d'autres protéines nucléaires dont Gadd45 qui se lie au PCNA. Gadd45 accroît la réparation de l'ADN mais a un rôle différent de celui de la p21 dans le contrôle de la phase G<sub>1</sub> (Smith *et al.*, 1994). Les cellules qui n'expriment pas la p53 peuvent encore exprimer Gadd45 en réponse à un dommage à l'ADN et entrer en phase S sans activer le point de contrôle de la phase G<sub>1</sub>. L'hypothèse est que si le dommage à l'ADN est trop profond pour

être réparé complètement et assez rapidement, alors l'apoptose peut être induite. Les fibroblastes des embryons de souris p21-déficientes présentent de sévères anomalies dans l'arrêt p53-dépendant en G<sub>1</sub> (Brugarolas *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 1995). Par contre, les souris p21-déficientes conservent l'apoptose p53-dépendante dans le thymus et l'épithélium du petit intestin (Brugarolas *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 1995). Donc la voie de l'arrêt p21-dépendant est distincte des voies de l'apoptose p53-dépendante (Attardi *et al.*, 1996).

Un régulateur majeur de la fonction de la p53 est la protéine ATM qui est une kinase dont l'activité est requise pour le contrôle de la phase G<sub>1</sub>. La transduction des signaux commence avec le produit du gène de l'ATM au site de dommage à l'ADN. Les signaux se propagent à travers une modification de la p53 pour augmenter sa demi-vie et accroître la transactivation de la p21/waf1/cip1, qui inhibe ensuite les kinases cycline-dépendantes de la phase G<sub>1</sub> pour bloquer la progression vers la phase S (El-Deiry *et al.*, 1994). Les cellules des patients atteints de l'ataxia telangiectasia présentent des défauts dans les points de contrôle de dommage à l'ADN, ce qui signifie que le produit du gène de l'ATM joue un rôle critique dans la transduction des signaux des sites de dommage à l'ADN aux éléments de régulation de la progression du cycle cellulaire (Kaufmann, 1998). Les cellules endommagées s'accumulent en phase G<sub>1</sub> avec des niveaux élevés de complexes cycline E/Cdk2 qui sont inactifs à cause de l'excès de la p21. Plusieurs types de dommages à l'ADN, incluant les lésions

produites par les radiations ionisantes et les enzymes de restriction, la stabilisation des complexes de clivage topoisomérase-ADN et la réplication de l'ADN endommagé, peuvent induire l'arrêt en G<sub>1</sub> par la p53 (Nelson & Kastan, 1994). L'inactivation du point de contrôle de la phase G<sub>1</sub> par des mutations dans la Cdk4 et la Cdk2 ou par l'inactivation de la p53 est associée à des fréquences accrues de mutations spontanées ou induites par des carcinogènes et à des aberrations chromosomiques (Havre *et al.*, 1995; Terada *et al.*, 1995). Comme l'ATM, la PARP et la DNA-PK contribuent à l'induction de la p53. La PARP se lie spécifiquement aux sites de dommage à l'ADN et transfère des ADP-riboses à une variété de protéines nucléaires. Même si la PARP est importante pour la stabilité génomique, elle n'est pas indispensable à l'apoptose (Wang *et al.*, 1997). Un rôle possible de la DNA-PK est la phosphorylation de la p53 pour augmenter sa stabilité. La p53 stabilisée va faciliter la réparation de l'ADN en établissant un arrêt de croissance avant la réplication de l'ADN et la mitose.

Nous disions plus haut qu'un des rôles possibles de la DNA-PK est de phosphoryler la p53 pour la stabiliser. L'inactivation de la DNA-PK est responsable du phénotype SCID "*severe combined immunodeficiency*" chez la souris. Les souris SCID sont radiosensibles et manquent de cellules immunitaires fonctionnelles à cause des défauts dans la recombinaison de l'ADN. Étant donné que la maturation des lymphocytes B et T requiert la brisure et la religation de l'ADN des immunoglobulines et des loci des

récepteurs des cellules T avant que celles-ci ne puissent répliquer leur ADN, il est possible que ce processus active le point de contrôle de la phase G<sub>1</sub> (Ashkenas & Werb, 1996).

Récemment, on a identifié une nouvelle protéine, la p73, qui partage des similitudes avec la p53. Le domaine de liaison à l'ADN de la p73 est à 63% identique à celui de la p53. D'autre part, la nature acide du domaine de transactivation est maintenue dans la p73 (Oren, 1997). La surexpression de la p73 peut aussi induire l'expression de la p21 jusqu'à des niveaux comparables à ceux obtenus avec la p53 de type sauvage. L'induction de la p21 est abolie quand l'Arg à la position 292 de la p73 est remplacée par un His; ce résidu est analogue à l'Arg 273 de la p53 qui est souvent mutée dans les cancers humains et dont la conversion en His abolit la capacité de la p53 à activer ces gènes cibles (Oren, 1997). Malgré ses similitudes structurelles et fonctionnelles avec la p53, la p73 n'est pas induite par les agents qui causent des dommages à l'ADN, ce qui suggère qu'elle a d'autres fonctions et qu'elle est impliquée dans d'autres réponses cellulaires à différents stimuli (De Laurenzi *et al.*, 1998).

#### **1.2.1.2 La voie p53-indépendante**

Des voies p53-indépendantes peuvent déterminer l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux agents qui causent des dommages à l'ADN. Les voies

apoptotiques peuvent être induites soit par un dommage à l'ADN, soit par des génotoxines qui affectent des composés cellulaires autres que l'ADN et induisent l'apoptose par des voies qui ne sont pas associées au dommage génétique (Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994). Ainsi, l'activation de la sphingolipase membranaire par les radiations  $\gamma$  n'est pas liée au dommage à l'ADN, mais induit l'apoptose dans certains tissus à travers la voie des céramides (Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994). Dans certaines cellules tels les lymphocytes T périphériques, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose suite à l'irradiation par les rayons  $\gamma$  sont sous le contrôle du facteur de transcription IRF-1 "*interferon regulatory factor 1*" (Tamura *et al.*, 1995). On note aussi que l'IRF-1 n'est pas requis dans l'apoptose induite par les radiations  $\gamma$  chez les thymocytes qui expriment la p53. Les monocytes U-937 qui n'expriment pas la p53 entrent en apoptose suite au traitement avec la CPT en démontrant tous les changements caractéristiques de la mort cellulaire programmée (Chap.2; Sané & Bertrand, 1998). Ces données suggèrent que les voies apoptiques impliquées par la p53 et l'IRF-1 sont, respectivement, indépendantes et dépendantes des types cellulaires (Tamura *et al.*, 1995).

L'arrêt du cycle cellulaire est un phénomène très complexe car la surexpression de la p21 peut être régulée par plusieurs voies indépendantes de la p53, dont une, requérant l'IRF-1, est aussi induite par les agents qui causent des dommages à l'ADN (Tanaka *et al.*, 1996). Des expériences portant sur des fibroblastes d'embryons de souris qui n'expriment pas la p53 et l'IRF-1 ont

montré que ces deux voies doivent agir de concert pour induire l'arrêt du cycle (Tanaka *et al.*, 1996). Donc, il existe un seuil d'activation de la p21 qui n'est pas facilement atteint par une seule voie de réponse à un dommage à l'ADN. Dans ce contexte, l'arrêt du cycle cellulaire p53-dépendant est également dépendant de l'activation d'une ou de plusieurs voies indépendantes de la p53.

### **1.2.2 Les points de contrôle du cycle cellulaire**

Le cycle cellulaire est typiquement divisé en quatre phases. Les périodes associées à la synthèse de l'ADN (phase S) et à la mitose (phase M) sont séparées par des intervalles de durée variable appelés  $G_1$  et  $G_2$ . Les voies de signalisation qui régulent la progression du cycle cellulaire sont liées à la phase  $G_1$  du cycle cellulaire (Grana & Reddy, 1995). Les points de contrôle du cycle de division cellulaire donnent à la cellule le temps de réparer les dommages à l'ADN avant la réplication et la mitose (Hartwell & Kastan, 1994). L'inactivation des fonctions de contrôle dote les cellules d'un avantage de croissance étant donné que les cellules continuent leur prolifération dans des conditions où des cellules normales arrêtent de proliférer. L'inactivation des fonctions de contrôle par les cellules germinales et par les mutations somatiques est associée à la carcinogenèse, à la déficience immunitaire et aux maladies neurodégénératives (Kaufmann & Paules, 1996).

Les contrôles du cycle cellulaire sont induits par une variété de stimuli allant de l'anaérobiose au déséquilibre métabolique, en passant par les dommages à l'ADN. Il semble, donc, que les cellules peuvent percevoir des conditions inappropriées à la progression du cycle cellulaire et retarder celle-ci, le temps de corriger le désordre perçu. Les points de contrôle sont de deux types, phénoménologique et génétique. Au niveau génétique, il y a les contrôles qui assurent le passage adéquat d'une étape à l'autre du cycle cellulaire et les éléments de réponse aux dommages à l'ADN. Ainsi, l'initiation de la synthèse de l'ADN dépend de la fin de la mitose; l'initiation de la mitose, de la fin de la synthèse de l'ADN et l'initiation de l'anaphase, de la fin de la métaphase (Kaufmann, 1998). Quand la mitose est initiée avant la fin de la réplication de l'ADN, les cellules se divisent avec des génomes incomplets. Quand l'anaphase est initiée avant que la métaphase ne soit complétée, il se produit une ségrégation inégale des chromosomes ou aneuploïdie. Et quand la synthèse de l'ADN est initiée avant la fin de la mitose, il y a polyploïdisation ou encore duplication du génome (Kaufmann, 1998).

En réponse à une variété de formes de dommage à l'ADN il peut y avoir un arrêt ou un délai dans la progression des cellules de la phase  $G_1$  à la phase S du cycle cellulaire, un ralentissement du taux d'initiation de la réplication dans les cellules en phase S ou un délai dans la progression des cellules de la phase  $G_2$  à la mitose.



La progression des cellules post-mitotiques (en phase  $G_1$ ) vers la phase de synthèse d'ADN (phase S) du cycle cellulaire est conduite par des protéines kinases hétérodimériques qui consistent en des cyclines et en des kinases cycline-dépendantes (Cdks). Pour être active, une Cdk doit s'associer à une cycline partenaire concomittamment à la phosphorylation/déphosphorylation de résidus spécifiques dans la sous-unité catalytique de la Cdk (Sherr & Roberts, 1995). Le premier complexe cycline/Cdk activé lors de l'entrée des cellules en  $G_1$  est composé d'une cycline de type D et de la Cdk4 ou de la Cdk6 selon le type cellulaire (Matsushime *et al.*, 1994). L'activité de la cycline D1 est requise dans la phase moyenne et tardive de  $G_1$ . En effet, la microinjection d'anticorps anti-cycline D1 dans des fibroblastes normaux en cours de  $G_1$  empêche l'entrée de ces cellules en phase S (Grana & Reddy, 1995). À la phase tardive de  $G_1$ , la cycline E se lie à la Cdk2 pour former une kinase active requise pour l'initiation de la réplication. Les niveaux de la cycline E oscillent périodiquement et après l'entrée des cellules en phase S, la cycline E est dégradée et la Cdk2 s'associe alors avec la cycline A. La synthèse de la cycline A est initiée à la fin de la phase  $G_1$ . Les cyclines A et B s'associent aussi à Cdc2/Cdk1 avec une activité maximale en  $G_2$  et  $G_2/M$  avant d'être rapidement dégradées (Grana & Reddy, 1995; Sherr & Roberts, 1995). Les Cdks doivent phosphoryler des substrats tel RB "*retinoblastoma tumor suppressor protein*" dont la modification est nécessaire pour quitter la phase  $G_1$  (Sherr, 1996). RB et d'autres protéines de la même famille (p130 et p107) contrôlent l'expression

génétiq ue médiée par les facteurs de transcription collectivement appelés E2F qui transactivent des gènes dont les produits sont importants pour l'entrée en phase S. Dans sa forme hypophosphorylée, RB se lie à E2F et inhibe son activité. La phosphorylation de RB, qui est considérée comme un moment critique pour le passage à travers le point de restriction, libère E2F qui peut alors transactiver les gènes cibles (Sherr, 1996). La progression du cycle cellulaire à travers le point de restriction et l'entrée en phase S n'ont pas lieu quand des cellules normales sont exposées à des radiations ionisantes ou à des traitements qui causent des lésions à l'ADN. Au contraire, la sous-unité inhibitrice p21 forme un complexe avec les hétérodimères cycline-Cdk, causant ainsi l'arrêt des cellules en  $G_1$  (Evan *et al.*, 1995). La Tyr17 de Cdk4 pourrait jouer un rôle dans le point de contrôle en  $G_1$  étant donné que la surexpression du mutant, dans lequel la Tyr a été remplacée par une Phe, abolit l'arrêt en  $G_1$  (Nigg, 1995; Terada *et al.*, 1995). La régulation de la phosphorylation des Tyr des Cdks est donc importante dans le contrôle du cycle cellulaire.

Alors que la liaison des cyclines est requise pour l'activité kinase des Cdks, d'autres protéines ont été identifiées dont la liaison inhibe l'activité des Cdks. Deux familles de protéines inhibitrices de l'activité des Cdks ont été identifiées. La famille de la p21/Waf1 est composée de la p21, de la p27/Kip1 et de la p57/Kip2 qui inhibent prédominamment les Cdks de la transition de la phase  $G_1$  à la phase S. La famille INK4 "*inhibitors of Cdk4*" inclut la p15, la p16, la p18 et la p19 qui sont souvent mutées ou délétées dans certains types de cancers

humains (King & Cidlowski, 1998). La p15 et la p16 se lient à la Cdk4 et ces gènes sont délétés dans beaucoup de lignées cellulaires cancéreuses (Kamb, 1995). La p27 interagit fortement avec le complexe cycline D1/Cdk4 mais très faiblement avec le complexe cycline E/Cdk2. Des niveaux élevés de la p27 ont été trouvés dans les cellules bloquées en G<sub>1</sub> par un traitement avec le TGF- $\beta$  (Polyak *et al.*, 1994). La p57 inhibe les activités des cyclines D1/Cdk4, D1/Cdk6, E/Cdk2, E/cdk3 et A/Cdk2 *in vitro*. De plus, la transfection de la p57 dans les cellules pulmonaires du vison induit l'arrêt en G<sub>1</sub> (Sherr & Roberts, 1995). En plus de lier et d'inhiber directement le complexe cycline-Cdk, la p21 forme un complexe avec le PCNA "*proliferating cell nuclear antigen*" qui inhibe l'activité de la polymérase d'ADN (Sanchez & Elledge, 1995).

Le point de contrôle de la phase G<sub>2</sub> cause un délai à l'entrée en mitose des cellules endommagées en G<sub>2</sub>. L'entrée en mitose est induite par le MPF "*Maturation Promoting Factor*" qui est composé de la Cdc2/Cdk1 et de la cycline B (King & Cidlowski, 1998). L'inhibition de l'entrée en mitose durant le délai de G<sub>2</sub> a été liée à l'inhibition du complexe cycline B/Cdk1. La Cdk1 peut se trouver associée aux cyclines A et B durant le cycle cellulaire, mais son association avec la cycline B coïncide davantage avec la transition G<sub>2</sub>/M (Nigg, 1995; O'Connor *et al.*, 1994). Le complexe cycline B/Cdk1 est régulé par des phosphorylations positives et négatives. Ainsi, la phosphorylation de la Thr161 est requise pour son activité kinase, alors que celle des Tyr15 et Thr14, résidant

dans le domaine de liaison à l'ATP de la Cdk1, inhibe cette activité. Comme les complexes cycline B/Cdk1 s'accumulent à la phase G<sub>2</sub>, ils sont inactivés par phosphorylation à ces sites par la kinase à double spécificité p107/wee1 et par la Cdk7. L'activation du complexe cycline B/Cdk1 par l'hydrolyse des phosphates inhibiteurs est accomplie par la Cdc25C. Cette phosphatase est elle-même activée par phosphorylation, suggérant que la formation d'une boucle autocatalytique cycline B/Cdk1/Cdc25C pourrait générer une activation explosive de l'activité kinase du complexe cycline B/Cdk1 pour induire l'entrée en mitose (Nigg, 1995; O'Connor *et al.*, 1994).

### **1.3 L'apoptose**

#### **1.3.1 Définition**

L'apoptose est un mode actif de mort cellulaire essentiel à la régulation de l'homéostasie cellulaire (Ellis *et al.*, 1991; Raff *et al.*, 1994; Thompson, 1995; Wyllie, 1987; 1992). Elle est définie par des changements morphologiques cellulaires caractéristiques associés à l'activation de cystéines protéases spécifiques (caspases) et à la modification de la chromatine. Ces modifications sont suivies de la digestion de l'ADN en fragments de haut poids moléculaire et en fragments oligonucléosomiques résultant de l'activation d'endonucléases (Kerr *et al.*, 1995; 1972; Wyllie, 1998; 1984). La cellule apoptotique se détache des cellules voisines suite à la perte de structures membranaires tels les

microvilli et les desmosomes et forme ensuite des vésicules. Très rapidement, et de façon irréversible, le cytoplasme se condense provoquant ainsi une augmentation de la densité de la cellule, une compacité des organelles cytoplasmiques et une condensation apparente de la chromatine nucléaire pour former des protubérances granulaires ou des structures torsadées qui tapissent la membrane nucléaire. En fait de condensation de la chromatine, il convient de souligner, d'emblée, que celle qui est observée pendant l'apoptose résulte de l'aggrégation de l'hétérochromatine après la dégradation de l'euchromatine et n'est donc pas une condensation active comme celle qu'on observe pendant la mitose (Hendzel *et al.*, 1998). Les pores nucléaires disparaissent et presque au même moment des corps apoptotiques se forment renfermant chacun une variété d'organelles (Wyllie, 1997). La cellule apoptotique est alors phagocytée très rapidement sans qu'aucune réaction inflammatoire ne soit causée étant donné que son contenu n'a pas eu le temps de se déverser dans le milieu extracellulaire (Savill, 1998; Savill & Haslett, 1995).

### **1.3.2 Historique**

La mort physiologique cellulaire a été observée dans plusieurs domaines de recherche biomédicale et dans chaque cas il s'est avéré que cette mort cellulaire survenait par des mécanismes moléculaires similaires. Cette observation a permis de suggérer que cette forme de mort a été conservée au cours de

l'évolution et que les organismes multicellulaires l'ont utilisée dans une grande variété de contextes et situations.

La mort cellulaire physiologique avait été déjà rapportée un siècle auparavant, mais c'est en 1951 qu'on a redécouvert la mort cellulaire pendant le développement des tissus embryonnaires (Glucksmann, 1951). Le terme *mort cellulaire programmée* n'a été introduit qu'en 1964 pour parler de la mort naturelle des cellules et des phénomènes qui y sont reliés (Lockshin & Williams, 1965). En 1972, on propose le terme *apoptose* pour définir la morphologie des morts cellulaires physiologiques (Kerr *et al.*, 1972). Quelques années plus tard, la première description de la mort cellulaire chez le nématode *Caenorhabditis elegans* est faite (Sulston, 1976). En 1979, on rapporte que les radiations et les agents alkylants causent la dégradation de l'ADN que l'on peut visualiser sous la forme d'échelle de fragments oligonucléosomiques d'ADN sur un gel d'agarose (Matyasova *et al.*, 1979). En 1980, on observe que les lymphocytes T cytotoxiques causent l'apoptose dans les cellules cibles et on associe également l'activation d'endonucléases à l'apoptose (Russell *et al.*, 1980; Wyllie, 1980). L'année 1982 voit la première démonstration d'une voie génétique de la mort cellulaire programmée par la description des effets des mutations du gène *ced-3* chez *C. elegans* (Horvitz *et al.*, 1982). Quatre années plus tard, l'étude des vers mutants pour *ced-3* et *ced-4* apporte la démonstration que des gènes spécifiques sont impliqués dans la mort cellulaire programmée

(Ellis & Horvitz, 1986). On observe aussi à la même époque que l'absence de facteurs de croissance induit la mort des lymphocytes T par apoptose (Duke & Cohen, 1986). En 1988, *BCL-2*, qui avait été identifié et cloné deux ans plus tôt, est décrit comme gène suppresseur de la mort cellulaire et une preuve expérimentale est donnée que l'inhibition de la mort cellulaire en association avec un oncogène peut causer une transformation suffisante des cellules menant au cancer (Vaux *et al.*, 1988). Vers la fin de la même année, on fait la première description de l'apoptose induite par le "*tumor necrosis factor*" (TNF) (Laster *et al.*, 1988). À la fin de 1989, Tsujimoto rapporte que la protéine BCL-2 confère la résistance au stress et aux agents chimiothérapeutiques (Tsujimoto, 1989). En 1992, les premiers nématodes mutants de *ced-9* sont identifiés alors que l'on démontre que *ced-9* inhibe l'activité de *ced-3* et *ced-4* (Hengartner *et al.*, 1992). Durant la même période, "*l'interleukin-1 beta converting enzyme*" (ICE) et *ced-4* sont clonés alors que l'on décrit la protéine CrmA comme étant un inhibiteur spécifique de ICE (Cerretti *et al.*, 1992; Ray *et al.*, 1992; Thornberry *et al.*, 1992; Yuan & Horvitz, 1992). Par ailleurs, l'inhibition de la mort cellulaire programmée chez *C. elegans* par BCL-2 humain est décrite, ce qui constitua la démonstration que le mécanisme de la mort cellulaire chez ce nématode est semblable à l'apoptose chez les mammifères (Vaux *et al.*, 1992). En 1993, on clone *BAX*, un homologue antagoniste de *BCL-2*; on clone également *BCL-x*, un autre homologue de *BCL-2*, et *ced-3* dans lequel on trouve des similitudes avec ICE qui est capable d'induire l'apoptose (Boise *et*

*al.*, 1993; Miura *et al.*, 1993; Oltvai *et al.*, 1993; Yuan, 1993). Au début de 1994, on publie le clonage de *ced-9* qui présente des similitudes avec *BCL-2* (Hengartner & Horvitz, 1994). Cette année va être prolifique car rapidement on propose un modèle qui unifie l'apoptose cellulaire et la mort causée par les lymphocytes T cytotoxiques; on prédit alors que la granzyme B pourrait agir comme les cystéines protéases (Vaux *et al.*, 1994). On montre aussi que l'apoptose induite par la p53 peut être inhibée par *BCL-2* (Chiou *et al.*, 1994) et que la p35 du baculovirus inhibe la mort cellulaire programmée chez *C. elegans* (Sugimoto *et al.*, 1994). Du coup, on isole et clone les protéases *nedd2* (caspase-2) et *CPP32* (caspase-3) (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 1994). Durant la même époque, on rapporte l'activation de différents pools d'endonucléases durant l'apoptose (Pandey *et al.*, 1994; Walker & Sikorska, 1994; Walker *et al.*, 1994). En 1995, on démontre que la mort cellulaire des lymphocytes T par activation est relayée par *CD95/CD95L* (Alderson *et al.*, 1995). Au milieu de cette année, on clone *mort-1/FADD* "*Fas-associated protein with death domain*" (Boldin *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1995). On rapporte que le *CrmA* inhibe l'apoptose induite par le *TNF* et *CD95/Fas/APO-1* (Tewari & Dixit, 1995), que la granzyme B active *CPP32* (Darmon *et al.*, 1995) et que la p35 est un inhibiteur spécifique des cystéines protéases (Bump *et al.*, 1995; Xue & Horvitz, 1995). À la fin de l'année 1995, on clone et on rapporte le rôle anti-apoptotique des *IAPs* "*Inhibitor of Apoptosis*" de même que leur interaction avec les *TRAFs* "*Tumor necrosis factor Receptor-*



*Associated Factor*"(Rothe *et al.*, 1995). L'effet inhibiteur des IAPs sur les caspases sera décrit quelques années plus tard (Deveraux *et al.*, 1997; 1998; Roy *et al.*, 1997; Tamm *et al.*, 1998). Au milieu de 1996, mach-1/FLICE/caspase-8 est cloné et on peut alors définir une voie apoptotique dont les signaux naissent dans la membrane cellulaire et sont relayés par les cystéines protéases (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996). En 1997, on rapporte la purification et le clonage de l'Apaf-1, homologue humain de ced-4, qui participe dans l'activation de la caspase-9 par le cytochrome c (Zou *et al.*, 1997). Aujourd'hui, il y a déjà plus de quatorze cystéines protéases qui ont été clonées dont 12 chez l'humain.

#### **1.4 La fragmentation de l'ADN durant l'apoptose**

La caractéristique biochimique particulière de l'apoptose est la dégradation extensive de l'ADN suite à l'activation d'endonucléases. L'importance de la fragmentation de l'ADN durant l'apoptose est d'autant plus grande que plusieurs études ont démontré que les extraits cytosoliques, obtenus de cellules induites en apoptose par divers traitements, activent la dégradation de l'ADN de noyaux cellulaires isolés (Ghibelli *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1996; Shimizu & Pommier, 1996; Solary *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 1996). La fragmentation de l'ADN pendant l'apoptose permet de libérer l'organisme des cellules incompatibles au maintien de son homéostasie.

## 1.5 La nécrose

Contrairement à la cellule apoptotique, la cellule nécrotique se lyse et le cytosol aussi bien que les structures nucléaires s'altèrent mais la disposition générale de l'hétéro- et de l'euchromatine est maintenue ainsi que les pores nucléaires (Higuchi *et al.*, 1998; Wyllie, 1997). Au cours de la nécrose la membrane plasmique se rompt et le contenu intracellulaire se déverse dans l'espace extracellulaire où les protéines mitochondriales, en particulier, vont induire une réaction inflammatoire; dans des conditions nécrotiques, la membrane cellulaire est endommagée avant que le noyau ne soit affecté (Higuchi *et al.*, 1998; Wyllie, 1997). Cependant, les caractéristiques de la nécrose peuvent se superposer à celles de l'apoptose si, pour une raison ou une autre, la cellule morte n'est pas reconnue et phagocytée par un macrophage. Ainsi, *in vitro*, les cellules apoptotiques démontrent une diminution progressive de leur volume à des niveaux subnormaux quelques heures après l'induction de l'apoptose. Leurs membranes deviennent perméables aux colorants tels le bleu de trypan ou l'iodure de propidium. Leur ultrastructure devient alors comme une série de vésicules, bien que des blocs apparents de chromatine condensée demeurent dans le noyau. Ce phénomène a été appelé nécrose secondaire (Wyllie, 1997).

## 1. 6 Activation de l'apoptose

Beaucoup d'études se sont attardées sur l'induction de l'apoptose dans le but de comprendre les mécanismes qui sous-tendent ce phénomène. Ces expériences ont inclus les traitements chimiques, la privation de facteurs de croissance, l'exposition à des conditions environnementales adverses telles les radiations ionisantes ou l'ischémie. Cependant, les manipulations qui induisent la mort cellulaire programmée dans un système cellulaire peuvent n'avoir aucun effet dans un autre système cellulaire et on ne peut prédire d'aucun agent qu'il puisse induire l'apoptose dans toutes les circonstances (Wertz & Hanley, 1996). Cette réponse variable peut être modulée par plusieurs facteurs comme l'environnement, le type cellulaire et son expression génétique caractéristique, le niveau de différenciation, la phase du cycle cellulaire et la dose de l'agent inducteur (Wertz & Hanley, 1996). Donc, le processus d'induction de l'apoptose doit être spécifique aux types cellulaires mais procède par des mécanismes communs une fois qu'il est initié.

La plupart des inducteurs chimiques de l'apoptose peuvent être classés dans l'une des catégories suivantes selon le site primaire de perturbation dans la cellule soient: la surface cellulaire, le cytosol, le cytosquelette, le noyau et les voies de signalisation intracellulaires.

### 1.6.1 Les topoisomérases d'ADN

Les topoisomérases (top 1, 2, et 3) d'ADN sont des enzymes nucléaires rencontrés chez toutes les espèces de procaryotes et d'eucaryotes. Ces enzymes catalysent et changent l'isomérisation topologique de l'ADN duplexe en faisant des brisures simple-brin (top 1 et 3) et des brisures double-brin (top 2) transitoires. Ces brisures réversibles de l'ADN résultent de réactions de transestérification qui lient un résidu tyrosine de l'enzyme à une extrémité de l'ADN. La top1 des mammifères permet la relaxation de l'ADN superenroulé, alors que la top2 permet la relaxation, le nouement/dénouement et la caténation/décaténation de l'ADN duplexe par un mécanisme typique de translation des brins d'ADN (Liu, 1989; Pommier & Kohn, 1989; Pommier *et al.*, 1994; Pommier & Tanizawa, 1993). Les topoisomérases d'ADN catalysent des changements dans la liaison des brins d'ADN selon un mécanisme concerté de clivage et de ligation. Les topoisomérases de type 1 des eucaryotes effectuent la relaxation de l'ADN superenroulé et cette activité est intimement liée à la transcription et à la réplication de l'ADN. Ces enzymes ont été largement étudiés à cause de leur importance fondamentale dans beaucoup de fonctions biologiques et aussi parce qu'ils sont la cible d'agents thérapeutiques de cancers humains étant donné leur rôle dans le métabolisme de l'ADN. Les topoisomérases relaxent l'ADN superenroulé en clivant et en rejoignant un brin du duplexe. Pour cela, elles ouvrent très brièvement les ponts phosphodiester

de l'ADN en formant des complexes enzymatiques de clivage sur un seul (top 1) ou sur deux (top 2) brins de l'ADN. Dans le cas de la top 1, le clivage de l'ADN est le résultat d'une transestérification d'une tyrosine active créant ainsi un intermédiaire covalent 3'-phosphotyrosyl (ADN-enzyme) et libérant un 5'-hydroxyl (5'-OH) (Burgin, 1997). Bien que cet intermédiaire covalent soit chimiquement stable, sa concentration à l'état actif est habituellement faible, parce que la réaction de ligation est plus rapide que la réaction de clivage. Pendant la ligation, le 5'-OH généré lors du clivage déplace l'intermédiaire covalent dans une autre réaction de transestérification et reforme le pont phosphodiester 5'-3'.

La top 1 est impliquée dans beaucoup de processus métaboliques de l'ADN comme lors de la transcription qui génère son superenroulement (Ostrander *et al.*, 1990; Wang, 1987; Wu *et al.*, 1988). Alors que la transcription se poursuit sur l'ADN, des superenroulements positifs et négatifs s'accumulent respectivement en avant et en arrière du complexe transcriptionnel (Brill *et al.*, 1987; Brill & Sternglanz, 1988; Wu *et al.*, 1988). De nombreuses évidences démontrent que la top 1 est impliquée dans la transcription. D'abord, les levures mutantes pour la top 1 voient leur taux de transcription réduit (Brill *et al.*, 1987; Thrash *et al.*, 1984) ; la top 1 interagit préférentiellement avec les sites actifs de transcription du génome (Fleischmann *et al.*, 1984); les sites de clivage de la top 1 ont été localisés dans les gènes transcriptionnellement actifs tels l'ADN

ribosomique (Garg *et al.*, 1987; Rose *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1988), les gènes du choc thermique (Fleischmann *et al.*, 1984; Gilmour & Elgin, 1987; Kroeger & Rowe, 1989), le gène de la tyrosine aminotransférase (Stewart & Sch:utz, 1987) et le gène *c-fos* (Stewart *et al.*, 1990). La CPT est un puissant inhibiteur de la synthèse d'ARN (O'Connor *et al.*, 1991) et conduit ainsi au blocage de la transcription (Stewart *et al.*, 1990); la microinjection d'anticorps contre la top 1 dans les noyaux induit le blocage de l'élongation de la transcription; enfin la top 1 et les polymérase d'ARN peuvent s'associer en complexes fonctionnels (Stewart *et al.*, 1990).

La top 1 est également impliquée dans la réplication de l'ADN qui génère, elle aussi, des superenroulements du fait de l'action des hélicases et de la progression de la fourche de réplication (Brill *et al.*, 1987). Ainsi on a montré, dans un système de réplication acellulaire, que la top 1 purifiée de mammifère pouvait supporter la réplication complète de l'ADN du virus SV40 (Yang *et al.*, 1987). De plus, le traitement des cellules infectées par le virus SV40 avec la CPT conduit à la production d'avortons d'intermédiaires réplcatifs de SV40 (Shin & Snapka, 1990a,b; Yang *et al.*, 1987). La CPT inhibe aussi rapidement la synthèse de l'ADN mais pour une période prolongée dans les cellules de mammifères (Duguet *et al.*, 1983; O'Connor *et al.*, 1991). Donc, à travers son activité de relâchement de l'ADN, la top 1 joue un rôle pivot dans le métabolisme de l'ADN, à savoir la réplication et la transcription. Des évidences

récentes suggèrent également que la top 1 pourrait jouer un rôle important dans la réparation et la recombinaison de l'ADN (Pommier *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 1998).

### 1.6.2 Les inhibiteurs des topoisomérases

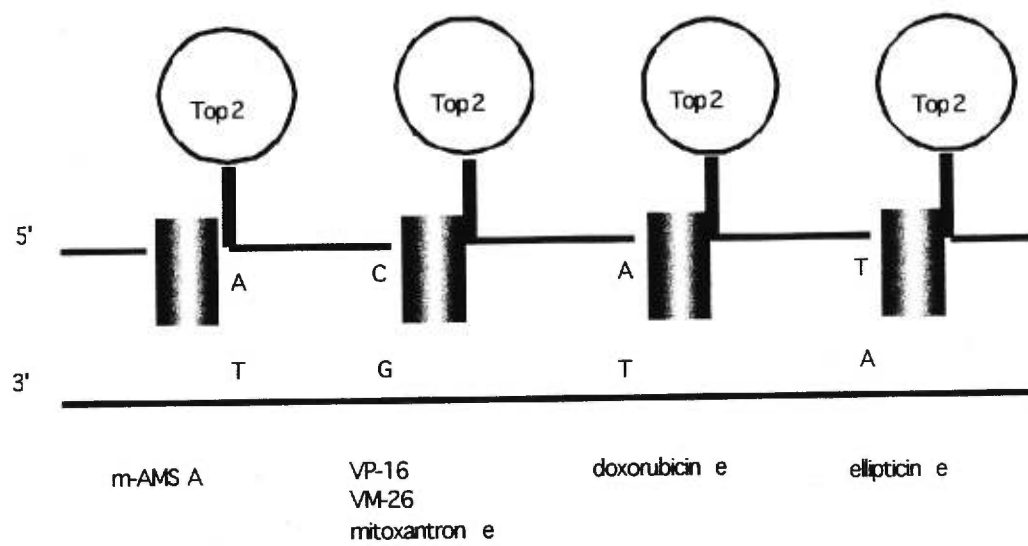
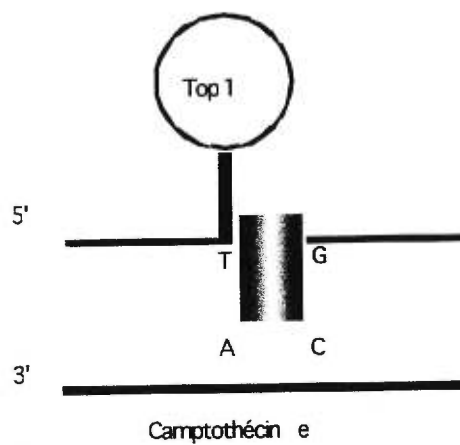
Les topoisomérases d'ADN sont aussi des cibles importantes dans la chimiothérapie des cancers. La top2 est la cible de certains des agents anticancéreux les plus actifs dont les agents intercalants tels la doxorubicine, le mitoxantrone, l'amsacrine et les ellipticines, et les agents non-intercalants tels l'étoposide et le téniposide. Quant à elle, la top1 est ciblée par la camptothécine et certains de ses dérivés hydrosolubles et semi-synthétiques tels le topotécan et le MDO-CPT (méthylènedioxycamptothécine) sont actuellement testés en clinique (Gore *et al.*, 1998; Kollmannsberger *et al.*, 1999; Liu, 1989; Pommier & Kohn, 1989; Pommier *et al.*, 1994; Pommier & Tanizawa, 1993).

L'activité antitumorale et le mécanisme primaire d'action de ces agents ont fait l'objet d'un grand nombre d'études, incluant des revues (Bertrand & Pommier, 1995; Liu, 1989; Pommier & Kohn, 1989; Pommier & Tanizawa, 1993). Les drogues anticancéreuses qui interfèrent avec les top1 et 2 le font en stabilisant un intermédiaire transitoire des réactions des topoisomérases. Ces drogues emprisonnent les complexes topoisomérase-ADN associés aux brisures simple- et double-brin de l'ADN (Fig. 1.1). La stabilisation de ces complexes constitue

**Figure 1.1 : Préférences de bases aux sites de clivage pour différents inhibiteurs de topoisomérases (Pommier *et al*, 1994).**

La top1 clive préférentiellement aux sites compris entre la base T à l'extrémité 3' et la base G à l'extrémité 5'. Dans le cas de la top2, chaque classe d'inhibiteur tend à favoriser le clivage à des sites spécifiques entre les extrémités 3' et 5'. Ce modèle suggère que les topoisomérases clivent d'abord l'ADN, et que les drogues se lient ensuite à des sites spécifiques pour empêcher la religation de l'ADN.





le mécanisme primaire de l'action des inhibiteurs des topoisomérases. La formation de ces complexes semble être responsable de l'activité antitumorale plutôt que l'inhibition des topoisomérases elle-même. De plus, les études sur des lignées cellulaires résistantes renforcent le concept selon lequel la formation des complexes topoisomérase-ADN est essentielle à la destruction de la cellule (Bertrand & Pommier, 1995; Liu, 1989; Pommier & Kohn, 1989; Pommier & Tanizawa, 1993). Bien que nécessaire, la formation des complexes n'est pas suffisante et l'apoptose doit résulter de lésions encore plus irréversibles de l'ADN et de l'induction de signaux intracellulaires ou de réponses conduisant à la mort cellulaire (Barry *et al.*, 1990; Bertrand *et al.*, 1991a; 1992; Holm *et al.*, 1989; Hsiang & Liu, 1989; Kupfer *et al.*, 1987; Pommier *et al.*, 1987; Pommier & Tanizawa, 1993; Schneider *et al.*, 1990; Solary *et al.*, 1994; Tanizawa *et al.*, 1993).

### **1.6.3 Cytotoxicité des inhibiteurs des topoisomérases**

Plusieurs familles de molécules cytotoxiques interagissent avec les topoisomérases d'ADN. Un certain nombre d'entre elles stabilisent les complexes de clivage induits par les topoisomérases, créant ainsi des cassures sur un seul ou sur les deux brins de l'ADN. Ces cassures semblent indispensables à l'induction d'un effet cytotoxique (Evans *et al.*, 1993). Les lésions spécifiques induites au niveau de l'ADN sont réversibles puisque les

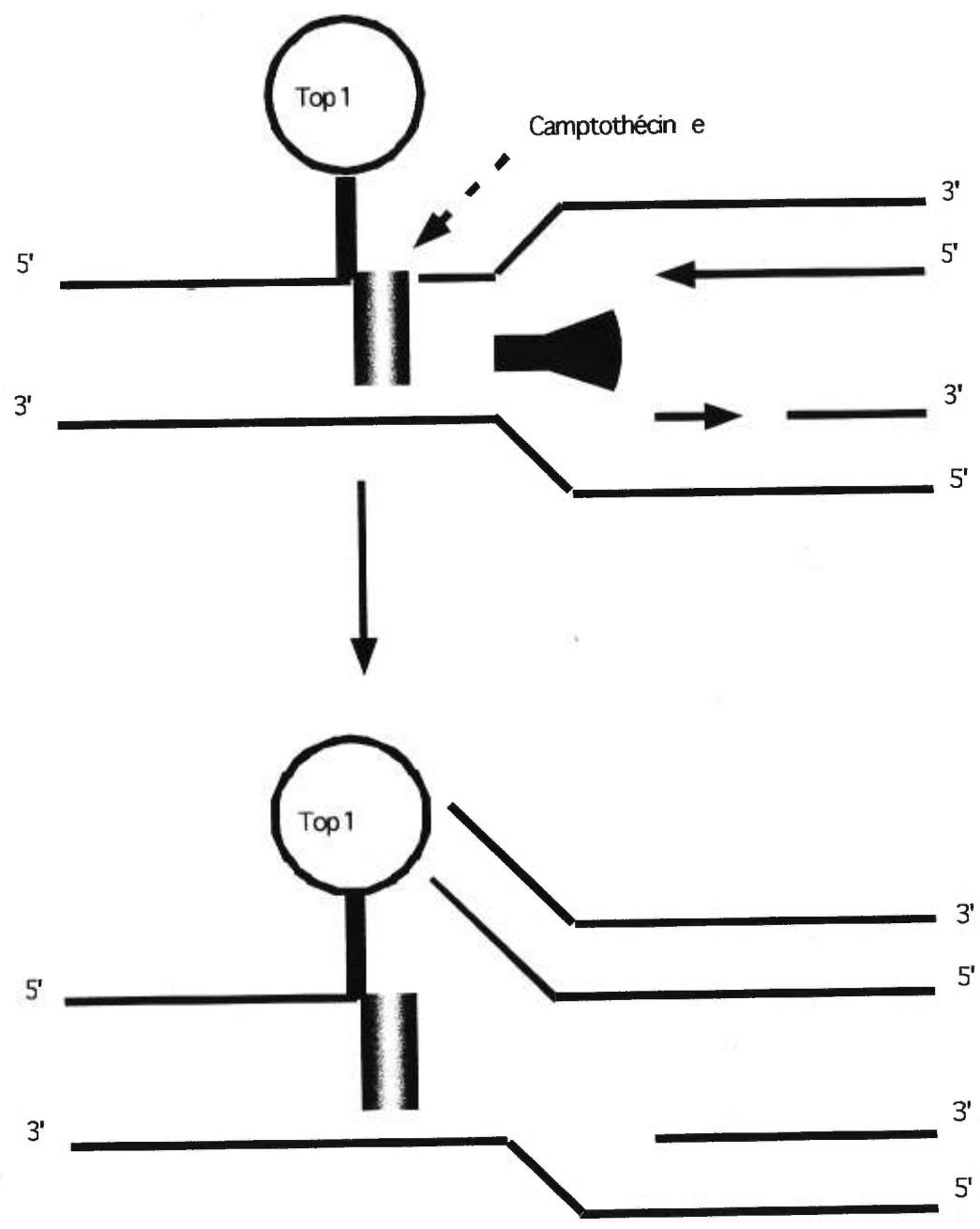
complexes de clivage stabilisés par les inhibiteurs des topoisomérases disparaissent rapidement lorsque l'on retire l'agent cytotoxique. Pour induire la mort cellulaire, elles doivent être converties en lésions secondaires qui conduiront la cellule à mettre en jeu son programme de mort cellulaire par apoptose ou à activer la nécrose (Solary *et al.*, 1996).

Dans le cas d'une induction de l'apoptose par la CPT, ces lésions de l'ADN se développent pendant la phase S du cycle cellulaire comme résultat de la collision entre les fourches de réplication de l'ADN et les complexes topoisomérase-ADN stabilisés par la drogue (Hashimoto *et al.*, 1995; Kaufmann, 1998; Rose *et al.*, 1988). De telles collisions rompent les complexes de clivage, générant ainsi des brisures double-brin qui ne sont pas associées à la topoisomérase (Fig. 1.2).

La camptothécine génère des brisures simple brin en présence de la top 1. Ces brisures ont la structure typique de celles causées par la top 1, avec leur extrémité 3' liée de façon covalente à l'enzyme par un pont phosphotyrosine (Champoux, 1978; Hsiang *et al.*, 1988). Les cassures sont appelées complexes de clivage (Hsiang *et al.*, 1985) parce qu'elles sont détectables après dénaturation des protéines avec du SDS "*sodium dodecylsulfate*" (Champoux, 1976; 1977). L'inhibition de la relaxation de l'ADN par la CPT se détecte beaucoup mieux quand des quantités limitées de top 1 sont utilisées (Jaxel *et al.*, 1989).

**Figure 1.2 : Modèle de dommage à l'ADN induit par la collision entre la fourche de réplication de l'ADN et les complexes de clivage stabilisés par la CPT (Pommier *et al.*, 1994).**

La CPT génère des brisures double-brin de l'ADN après la collision d'une fourche de réplication avec un complexe de clivage de la top1. De telles lésions persistent même après enlèvement de la CPT. La pertinence clinique de cette observation est due au fait que la cytotoxicité de la CPT dépend de la réplication de l'ADN et de la quantité de cellules en phase S du cycle cellulaire.



L'augmentation des quantités de top 1 lève habituellement l'inhibition par la CPT (Jaxel *et al.*, 1989). L'explication la plus plausible de cet effet est que la CPT n'emprisonne qu'une partie des complexes de clivage. Donc, quand la top 1 est en excès, les sites qui sont insensibles à la CPT demeurent catalytiquement actifs. Les voies de réparation de l'ADN peuvent rejoindre les brisures double-brin mais les sites de jonction manifestent souvent des pertes de séquences d'information ce qui suggère que le processus de réparation des brisures double-brin inclut certaines digestions exonucléolytiques pour créer des extrémités cohésives qui peuvent se fusionner (Phillips & Morgan, 1994). Cette exonucléolyse pendant la réparation fait que même quand les chromatides sont alignées correctement, des séquences d'information sont perdues lors de la fusion. Les brisures double-brin peuvent également être reliées de façon aberrante quand les chromatides brisées sont réalignées incorrectement, générant ainsi des translocations. Le réalignement erroné des brisures double-brin générées lors de la maturation des immunoglobulines et des récepteurs des cellules T semble d'ailleurs être à l'origine de l'activation des oncogènes tels *c-myc* et *c-abl* dans la genèse des leucémies et des lymphomes. La stabilisation des complexes de clivage par les inhibiteurs de topoisomérases soustend leur génotoxicité et leur efficacité comme drogues antinéoplasiques (Rose *et al.*, 1988).

#### 1.6.4 Inhibiteurs des topoisomérases et apoptose

Des équipes ont rapporté que les inhibiteurs des top1 et 2 peuvent causer la mort cellulaire en induisant l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires tumorales (Barry *et al.*, 1990; Bertrand *et al.*, 1991b; 1993; Del Bino & Darzynkiewicz, 1991; Jaxel *et al.*, 1988; Kaufmann, 1989; 1998; Solary *et al.*, 1993b; Walker *et al.*, 1991). Des marqueurs moléculaires ont été maintenant identifiés et liés à l'activation de la mort cellulaire programmée. Quatre éléments-clés sont associés à l'apoptose; d'abord, des changements morphologiques caractéristiques (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1981; 1984); le relâchement du cytochrome c (Li *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1996; Susin *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1997); l'activation d'une série de caspases et le clivage spécifique de leurs substrats respectifs (Alnemri *et al.*, 1996; Kumar & Harvey, 1995; Patel *et al.*, 1996); et enfin l'activation des voies impliquées dans la digestion de l'ADN nucléaire en fragments de masse moléculaire élevée et en fragments oligonucléosomiques (Oberhammer *et al.*, 1993a; Pandey *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1994; Wyllie, 1980; 1984).

Dans les cellules HL-60, U-937 et Namalwa traitées avec l'un ou l'autre des inhibiteurs de top1 et 2, les changements morphologiques observés en microscopie électronique sont caractéristiques de l'apoptose et ont été aussi associés à la fragmentation secondaire de l'ADN visualisée sous la forme d'une

échelle de fragments oligonucléosomiques avec une périodicité approximative de 150-180 pb sur un gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium. Cette fragmentation secondaire a été convenablement quantifiée et caractérisée dans un essai sur filtre qui a été développé (Bertrand *et al.*, 1993; 1995; Bertrand & Pommier, 1995) et qui permet la distinction entre les lésions primaires de l'ADN causées par les inhibiteurs de topoisomérases et celles impliquées dans la mort cellulaire programmée. Cette fragmentation secondaire de l'ADN peut également être induite dans un système acellulaire (Bertrand *et al.*, 1993; 1995; Bertrand & Pommier, 1995). Les fragments oligonucléosomiques de l'ADN peuvent être induits en incubant des noyaux isolés de cellules contrôles avec du cytosol de cellules en apoptose traitées à la CPT. Il n'y a pas de fragmentation oligonucléosomique en présence de cytosol de cellules non traitées à la CPT. Plusieurs événements biochimiques qui contribuent à la mort cellulaire programmée ont été récemment élucidés chez les cellules de mammifères. L'induction de l'apoptose par une variété de stimuli implique des cascades protéolytiques dans le cytosol. Plusieurs cystéines protéases spécifiques, connues maintenant sous le nom de caspases, semblent jouer un rôle central dans le programme de suicide cellulaire qui définit l'apoptose. Également, d'autres sérines et cystéines protéases actives semblent jouer un rôle dans l'apoptose induite par les inhibiteurs de topoisomérases et nos résultats suggèrent qu'une voie CrmA/TPCK-sensible est impliquée dans la fragmentation oligonucléosomique induite par la CPT (Bruno *et al.*, 1992;



Dubrez *et al.*, 1996; Ghibelli *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1996; Chap.2, Sané *et al.*, 1997; Shimizu & Pommier, 1996; Solary *et al.*, 1996; Weaver *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1996).

### **1.7 Les protéases de l'apoptose**

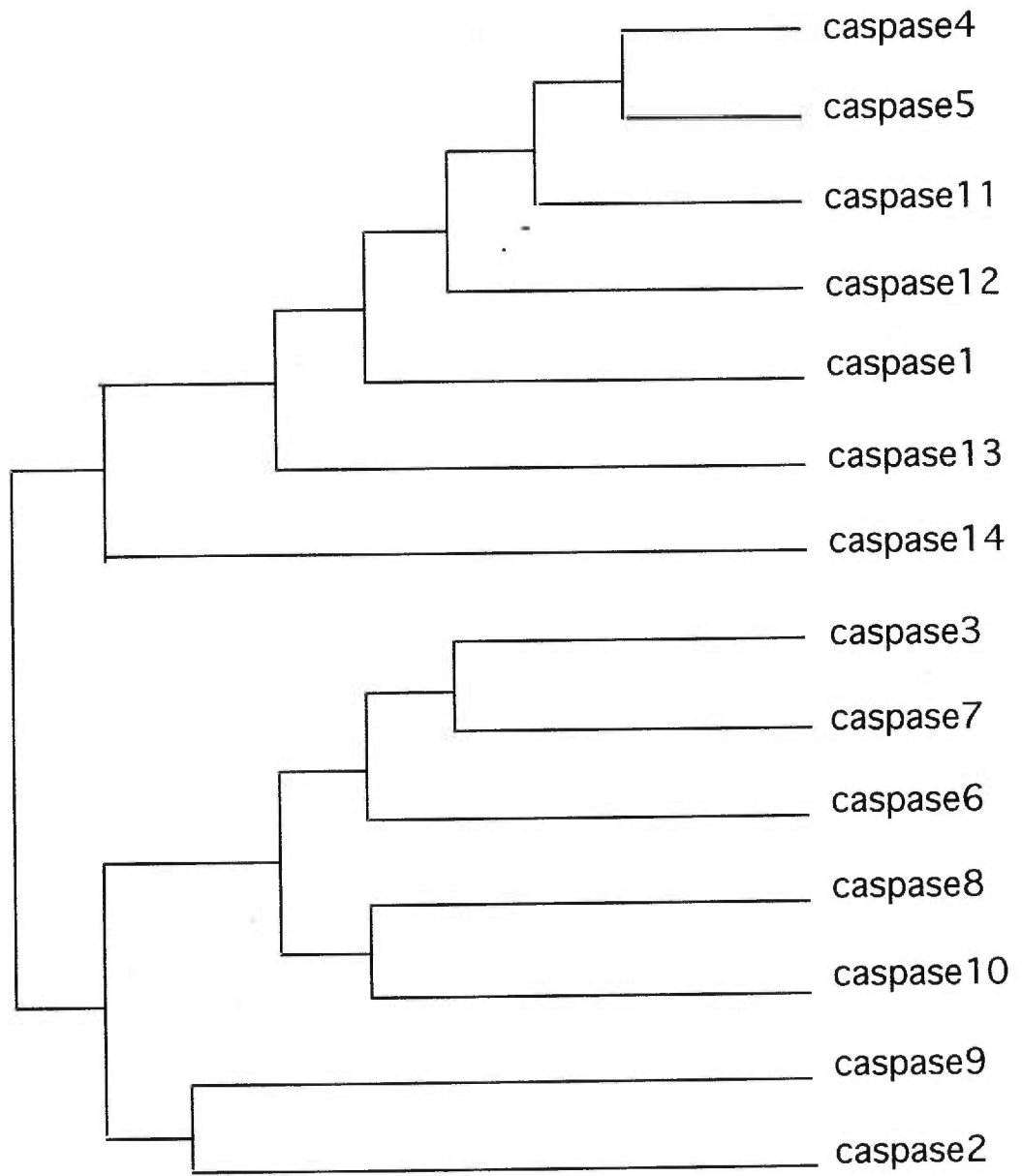
Bien que les voies biochimiques précises impliquées dans la mort cellulaire programmée soient encore mal définies, il est clair maintenant que les protéases jouent un rôle essentiel à la fois dans les signaux initiaux et dans les processus en aval qui conduisent au phénotype apoptotique. Celles qui sont connues pour y être impliquées incluent les cystéines protéases de la famille des ICE/CED-3 appelées *caspases* (cysteine aspartic proteases) (Alnemri *et al.*, 1996) et la granzyme B, la sérine protéase dérivée des lymphocytes T cytotoxiques.

### 1.7.1 Les caspases

Une famille grandissante de caspases ou cystéines protéases tel Ced-3/ICE ont été identifiées. Les caspases sont divisées en trois sous-familles sur la base de leurs degrés d'homologie et par analyse phylogénétique (Fig. 1.3). La sous-famille des ICE inclut ICE/caspase-1 et ses isoformes épissées (Alnemri *et al.*, 1995; Yuan, 1993), Tx/Ich-2/ICE rel-II/caspase-4 (Faucheu *et al.*, 1995; Kamens *et al.*, 1995; Munday *et al.*, 1995), Ty/ICE rel-III/caspase-5 (Faucheu *et al.*, 1996; Munday *et al.*, 1995), mIch-3/caspase-11 (Wang *et al.*, 1996), mIch-4/caspase-12 (Cryns & Yuan, 1998), ERICE/caspase-13 (Humke *et al.*, 1998) et Viz/Mice/caspase-14 (Hu *et al.*, 1998a); la sous-famille des CPP32 inclut CPP32/Yama/Apopain/caspase-3 (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1994; Nicholson *et al.*, 1995; Tewari *et al.*, 1995), Mch-2/caspase-6 (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1995a), Mch-3/ICE-Lap3/Cmh-1/caspase-7 (Duan *et al.*, 1996a; Fernandes-Alnemri *et al.*, 1995b; Lippke *et al.*, 1996), Mch-4/caspase-10 (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996), Mch-5/Flice/Mach/caspase-8 (Boldin *et al.*, 1996; Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996) et la troisième sous-famille inclut Ich-1 [L et S]/caspase-2 (Wang *et al.*, 1994) et Ice-Lap6/Mch6/caspase-9 (Duan *et al.*, 1996b).

**Figure 1.3 : La famille des caspases**

Les caspases peuvent être groupées en trois sous-familles, basées sur les degrés d'homologie avec caspase-1, caspase-3 et caspase-2.



Les caspases peuvent également être classées dans trois groupes selon leur préférence de clivage. Les membres du groupe I (caspase-1,-4,-5) préfèrent la séquence térapeptidique (W/L)EHD; ceux du groupe II (caspase-2, -3, -7, CED-3) reconnaissent préférentiellement le motif DEXD et ceux du groupe III (caspase-6, -8, -9) reconnaissent le motif (I/V/L)EXD (Thornberry *et al.*, 1997). La sérine protéase granzyme B reconnaît le motif peptidique similaire (I/V)EPD (Thornberry *et al.*, 1997). Ce profil de spécificité est concordant avec un modèle selon lequel les caspases agissent partiellement en cascade et partiellement en parallèle, de telle sorte qu'une ou plusieurs protéases activatrices (caspase-2, -8, -9 et granzyme B) activent une ou plusieurs protéases effectrices (caspase-3, -6, -7 et CED-3) pour cliver des substrats spécifiques et conduire au phénotype apoptotique.

Dans les cellules, les caspases existent sous forme de zymogènes (procaspases) qui ont des prodomaines en position N-terminale et de grandes ou petites sous-unités catalytiques (Salvesen & Dixit, 1997). La classification basée sur la longueur des prodomaines permet de différencier les caspases initiatrices (e.g., caspase-8, -10, -2, ou -9) et les caspases effectrices (e.g., caspase-3, -6, ou -7). Les caspases qui possèdent de longs prodomaines interagissent à travers leurs motifs CARD "*caspase recruitment domain*" avec des molécules adaptatrices comme le FADD (Hofmann *et al.*, 1997) ou avec l'Apaf-1 (Srinivasula *et al.*, 1998). Ainsi l'interaction entre les CARDS de FADD et du prodomaine de la

procaspase-8 permet la formation d'un DISC "*death-inducing signaling complex*" durant l'apoptose induite par le FasR (Enari *et al.*, 1996), alors que l'oligomérisation du domaine CARD de l'Apaf-1 permet la formation du complexe Apaf-1-caspase-9 (Srinivasula *et al.*, 1998).

### 1.7.2 Voies d'activation des caspases

Plusieurs caspases sont activées dans les cellules traitées avec des drogues anticancéreuses. À l'origine, la caspase-3 (CPP32) et la caspase-6 (Mch2) ont été les plus abondamment étudiées chez les cellules apoptotiques humaines. Mais, aujourd'hui plusieurs évidences soutiennent aussi que les caspase-9, -7, -2 et -8 sont activées (Datta *et al.*, 1996; Droin *et al.*, 1998; Dubrez *et al.*, 1996; Faleiro *et al.*, 1997; Fulda *et al.*, 1998; Macfarlane *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 1997a; Chap.2, Sané & Bertrand, 1998; Schmitt *et al.*, 1998a,b; Yoshida *et al.*, 1998b).

Plusieurs études ont révélé l'importance des caspases dans l'exécution du processus de la mort cellulaire (Alnemri, 1997; Alnemri *et al.*, 1996; Kumar & Harvey, 1995; Patel *et al.*, 1996). Suite à un stimulus de mort cellulaire, une cascade protéolytique est mise en route qui conduit à l'activation des caspases pour orchestrer la régulation et l'exécution des étapes de l'apoptose. Toutes les caspases possèdent une séquence pentapeptidique (QACXG) qui contient le

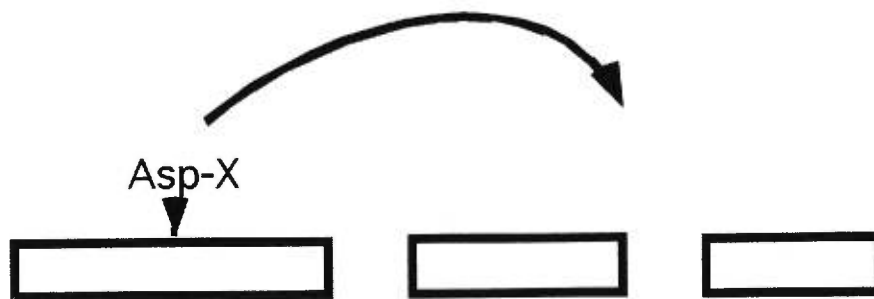
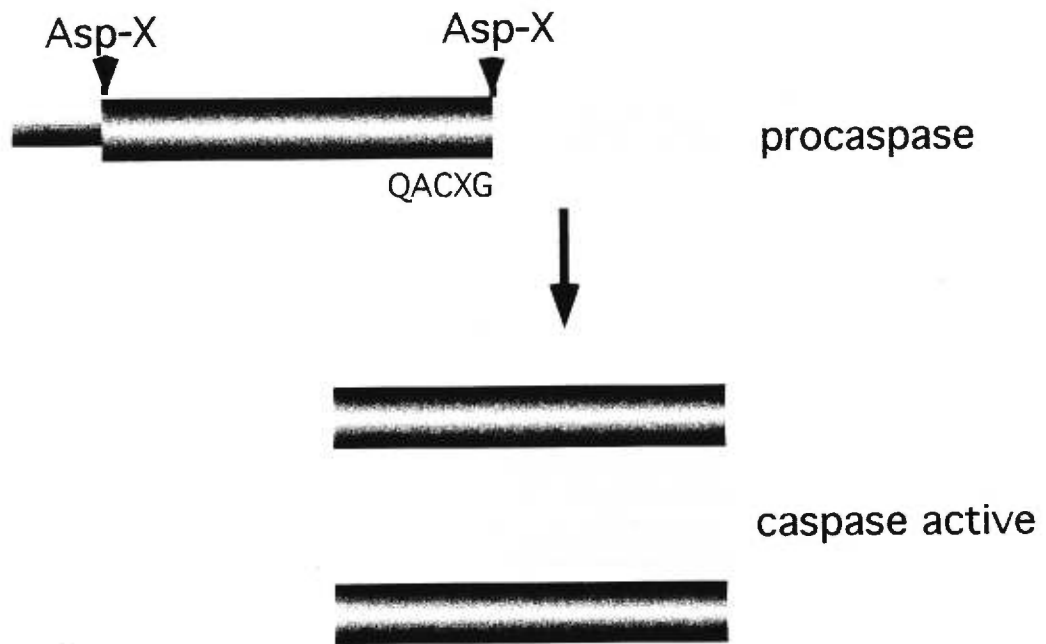
résidu cystéine actif et sont synthétisées dans les cellules sous forme de proenzymes inactifs qui doivent subir une activation par protéolyse au niveau des sites Asp-X pour former des hétérodimères catalytiquement actifs. L'activation est soit autocatalytique, soit médiée par un autre enzyme possédant la même spécificité de clivage (Alnemri, 1997; Cryns & Yuan, 1998; Stennicke & Salvesen, 1998). Donc, la génération de caspases actives exige leur clivage au résidu Asp interne entre la grande et la petite sous-unité catalytique, et un autre clivage au résidu Asp entre le prodomaine et la grande sous-unité. Une fois activées, les caspases peuvent cliver leurs substrats et d'autres procaspases pour générer des sous-unités actives (Salvesen & Dixit, 1997). Les caspases effectrices clivent enfin des protéines cellulaires telles la PARP, les lamines, le Dff, la fodrine, la gelsoline, la protéine kinase C $\delta$ , le Rb, la DNA-PK, et d'autres, résultant en des changements morphologiques et à la fragmentation de l'ADN typiques de l'apoptose (Fraser *et al.*, 1996; Martin & Green, 1995)(Fig.1.4).

L'activation de certains récepteurs exprimés à la surface des cellules induit rapidement l'activation de caspases initiateuses de l'apoptose et tout le processus qui aboutit à la mort cellulaire. TNF $\alpha$  est certainement le prototype de médiateur de l'apoptose. TNF $\alpha$  est une cytokine responsable de la mort cellulaire associée à l'activité anti-tumorale, au choc septique, à l'inflammation et aux désordres auto-immuns. Les récentes percées dans la recherche ont

**Figure 1.4 : Modèle d'activation protéolytique des caspases pendant l'apoptose**

Synthétisées sous la forme de proenzymes inactifs constitués de deux sous-unités et d'un prodomaine, les caspases sont activées par protéolyse ou par autocatalyse au site Asp-X interne, entre la grande et la petite sous-unité, et au site Asp-X entre le prodomaine et la grande sous-unité. Les différentes sous-unités ainsi séparées interagissent en hétérodimères pour former la caspase active qui va enfin cliver d'autres procaspases ainsi que des protéines homéostatiques (e.g. PARP) essentielles au maintien des fonctions cellulaires normales et des protéines de structure (e.g. les lamines) pour aboutir à la mort cellulaire.





Protéines cibles :

- autres caspases
- protéines homéostatiques et de réparation
- protéines de structure

Apoptose

identifié plusieurs constituants de cette voie de signalisation (Wertz & Hanley, 1996).

Au cours de l'apoptose induite par le CD95/APO-1/Fas et le TNF $\alpha$ , la cascade d'activation des caspases commence à être élucidée. Il apparaît que l'interaction du ligand du Fas et du TNF $\alpha$  avec leurs récepteurs (Fas/APO-1/CD95 et TNFR-1 respectivement) culmine dans la formation d'un complexe comprenant le récepteur, les protéines adaptatrices FADD/MORT-1 ou TRADD et la procaspase-8. Le récepteur et la protéine adaptatrice interagissent par dimérisation de leurs régions homologues intracellulaires appelées DD "*death domain*". À son tour, le FADD/MORT-1 "*mediator of receptor-induced toxicity 1*" et/ou TRADD s'associe avec la procaspase-8 par l'intermédiaire du DED "*death effector domain*" présent dans les deux protéines. Subséquemment, l'activation de la caspase-8 survient par l'autoprotéolyse de deux procaspase-8 voisines. Le recrutement et l'oligomérisation, suivis du clivage et de l'activation de la caspase-8, culminent dans le clivage et l'activation de caspases effectrices telle la caspase-3 (Muzio *et al.*, 1998; Nagata, 1997) ou encore dans le clivage du BID (BH3 interacting domain) qui va activer la voie mitochondriale en induisant le relâchement du cytochrome c (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998).

Le CD95/APO-1/Fas et le CD95L jouent un rôle important, essentiellement dans trois types d'apoptose physiologique: (i) la délétion périphérique des

lymphocytes T matures activés à la fin d'une réponse immunitaire; (ii) la destruction des cellules infectées par des virus ou des cellules cancéreuses par les cellules T cytotoxiques et les cellules NK; et (iii) la destruction des cellules inflammatoires aux sites d'immunité privilégiée comme l'oeil (Ashkenazi & Dixit, 1998). Ainsi, les lymphocytes T cytotoxiques induisent l'apoptose chez les cellules-cibles à travers la liaison du CD95L au récepteur CD95/Fas/APO-1 et la voie perforine/granzyme B qui dépend du relâchement des perforines et de la granzyme B par dégranulation (Berke, 1995; Spaner, 1998). Pour induire l'apoptose, la granzyme B va pénétrer dans les cellules-cibles où il va activer les caspases. Parallèlement, les cellules T activées expriment le récepteur Toso qui les protège de la mort cellulaire programmée. En fait, pour inhiber l'apoptose induite par le Fas, le Toso va induire l'expression de la FLIP qui va empêcher le recrutement de la caspase-8 par le FADD (Hitoshi *et al.*, 1998).

Les mitochondries jouent un rôle critique dans l'apoptose en relâchant des protéines inductrices de leur espace intermembranaire dans le cytoplasme, où elles activent les caspases impliquées dans la mort cellulaire programmée. Parmi les protéines apoptogéniques relâchées par les mitochondries on peut citer le cytochrome c/Apaf-2 et l'AIF (Li *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1996; Susin *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1997). Le relâchement des protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial est inhibé par les protéines anti-apoptotiques telles Bcl-2 et Bcl-xL (Kluck *et al.*, 1997a; Reed, 1997; Susin *et al.*, 1997;

Yang *et al.*, 1997). Bien que le mécanisme de libération des protéines intermembranaires des mitochondries durant l'apoptose soit inconnu, il semble que la perméabilité mitochondriale soit impliquée dans ce processus (Kroemer *et al.*, 1997; Skulachev, 1996). Cette perméabilité naît de la formation de pores protéiques dans la membrane interne de la mitochondrie qui la rend perméable aux molécules solubles de faible poids moléculaire. La baisse du potentiel membranaire mitochondrial due à la perméabilité est un des événements précoces de plusieurs types d'apoptose (Zamzami *et al.*, 1995a,b; 1996; 1997). En fait, l'induction de la perméabilité mitochondriale provoque un relâchement généralisé des protéines intermembranaires mitochondriales présumément par la rupture de la membrane externe et ces protéines sont capables d'induire des caractéristiques apoptiques sur des noyaux isolés (Scarlett & Murphy, 1997). BCL-2 et BCL-xL sont localisées essentiellement à la membrane externe mitochondriale (Reed, 1997) et leur surexpression bloque la perméabilité mitochondriale (Kroemer *et al.*, 1997).

L'AIF est un activateur de protéases qui peut activer la caspase-3 mais induit également la fragmentation de haut poids moléculaire de l'ADN dans les noyaux isolés. Après sa libération, l'AIF contribue également à amplifier les signaux mitochondriaux en augmentant la perméabilité mitochondriale (Susin *et al.*, 1998).

Le cytochrome c/Apaf-2 est une protéine intermembranaire mitochondriale normalement impliquée dans le transport d'électrons entre le complexe III (cytochrome bc1) et le complexe IV (cytochrome oxydase) de la chaîne respiratoire. De plus, on a rapporté que le cytochrome c/Apaf-2 est relâché suite à une dépolarisation de la membrane mitochondriale par le CAF "*Caspase-activated Factor*" (Stemans *et al.*, 1999) et s'accumule dans le cytosol où il active les caspases en se liant à l'Apaf-1, l'homologue humain de Ced-4 en présence de la dATP, pendant l'induction de l'apoptose et que cet événement est un prérequis général pour le processus apoptotique (Kharbanda *et al.*, 1997; Kluck *et al.*, 1997b; Li *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997). Récemment, on a démontré que l'Apaf-1 est la molécule adaptatrice qui interagit avec la caspase-9 en présence du cytochrome c et de la dATP (Srinivasula *et al.*, 1998). Cette interaction aboutit à l'activation de la caspase-9 qui, à son tour, active les caspase-3 et -7; l'activation de la caspase-6, dans un tel contexte, se fait par la caspase-3 (Cecconi *et al.*, 1998; Perkins *et al.*, 1998; Srinivasula *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998b). Les caspase-2, -8 et -10 sont activées dans les extraits acellulaires en présence du cytochrome c mais, par contre, les caspase-1, -4 et -5 ne sont pas activées dans ces mêmes conditions (Slee *et al.*, 1999). Les essais d'associations *in vitro* ont, par ailleurs, confirmé que la caspase-9 se lie sélectivement à l'Apaf-1 et que les caspase-1, -2, -3, -6, -7, -8 et -10 ne le font pas. De plus, l'exclusion de la caspase-9 des extraits cellulaires abolit l'activation induite par le cytochrome c des caspase-2, -3, -6, -

7, -8 et -10, suggérant que la caspase-9 est requise pour toutes ces activations en aval (Slee *et al.*, 1999). Dans la même veine, on a montré que BCL-2 et BCL-xL bloquent l'apoptose en empêchant le relâchement du cytochrome *c*/Apaf-2 des mitochondries (Kharbanda *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Kluck *et al.*, 1997a; Yang *et al.*, 1997). Cependant, malgré le rôle important du cytochrome *c*/Apaf-2 dans l'apoptose, son accumulation dans le cytosol n'est pas un phénomène universel durant l'induction de la mort cellulaire programmée. En fait, l'accumulation du cytochrome *c*/Apaf-2 dans le cytosol dépend du type cellulaire et de l'agent inducteur de l'apoptose. Considérant que le cytochrome *c*/Apaf-2 est un élément essentiel de la chaîne respiratoire mitochondriale, on peut dire qu'il y a des voies dépendantes et indépendantes des mitochondries dans l'apoptose (Fulda *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 1998).

La surexpression de l'Apaf-1 sensibilise les cellules à l'effet des drogues anticancéreuses (Perkins *et al.*, 1998) en interagissant par son motif CARD avec celui de la procaspase-9 de manière à conduire au clivage et à l'activation séquentielles de la caspase-9/Apaf-3 et de la caspase-3 (Cecconi *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1997; Srinivasula *et al.*, 1998). Ainsi donc, l'effet proapoptotique de la surexpression de l'Apaf-1 est comparable à celui de la surexpression du FADD qui induit l'oligomérisation et l'activation de la caspase-8 pour aboutir à l'apoptose (Chinnaiyan *et al.*, 1995; Muzio *et al.*, 1998). D'autre part, les cellules qui n'expriment pas l'Apaf-1 ou la caspase-9 sont protégées contre

l'apoptose induite par le cisplatine et l'étoposide alors que celles qui n'expriment pas la caspase-8 et la caspase-2 ne sont pas protégées contre la mort cellulaire induite par l'étoposide ou la doxorubicine (Bergeron *et al.*, 1998; Kuida *et al.*, 1998; Varfolomeev *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998b). Ces observations démontrent la participation de la voie mitochondriale dans l'activation de l'apoptose induite par les agents anticancéreux tels le cisplatine et l'étoposide.

### 1.7.3 Les sérines protéases

De nombreuses évidences démontrent l'implication de sérines protéases dans la mort cellulaire programmée et leur activité est requise pour la cytotoxicité cellulaire des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK "*natural killer*" (Altieri, 1995; Marthinuss *et al.*, 1995; Williams & Henkart, 1994). L'implication de sérines protéases dans l'apoptose via la caspase-3 a été suggérée et on a rapporté la protéolyse de celle-ci par la sérine protéase granzyme B des lymphocytes T cytotoxiques lors de l'apoptose induite par ces cellules (Berke, 1995; Darmon *et al.*, 1995).

L'apoptose induite par le Fas, dans les cellules Hela D98AH2, est concomitante à l'activation de la caspase-3 inhibable par le DFP "*diisopropyl fluorophosphate*", un inhibiteur de sérines protéases. En fait, le DFP inhibe une activité

retrouvée dans les cytoplastes de ces cellules, ce qui suggère fortement que les sérines protéases jouent un rôle important dans l'activation de la caspase-3. La sérine protéase trouvée dans les cytoplastes de ces cellules est semblable à la sérine protéase V8 de *Staphylococcus aureus*. Cette sérine protéase active la caspase-3 par clivage au site p3 ainsi que le clivage du tetrapeptide ESMD-MCA l'a montré (Suzuki *et al.*, 1997). Le clivage de ce site est inhibé par le DFP. Par contre, le site p17 est clivé par une cystéine protéase, en l'occurrence la caspase-10, la caspase-9 ou la caspase-8 (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996), pour l'activation complète de la caspase-3. Le clivage du site p17 est inhibé par le DEVD-CHO, ce qui suggère une implication directe d'un membre de la sous-famille de la CPP32. Ces données suggèrent qu'à moins d'un autoclivage, l'activation de la caspase-3 se fait par une sérine protéase (site p3) et par une cystéine protéase (site p17) de la sous-famille de la CPP32.

De plus, on a purifié des cellules U-937 une sérine protéase, l'AP24, qui est rapidement activée quand ces cellules sont induites en apoptose par le TNF $\alpha$  ou par les UV (Wright *et al.*, 1994). Cette sérine protéase induit la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN sur des noyaux purifiés (Wright *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 1994). Il est probable que l'AP24 agisse d'abord sur un substrat, telle une endonucléase, localisé dans le noyau. Alternativement, l'AP24 peut aussi cliver d'autres molécules qui vont, à leur tour, activer des nucléases endogènes.



La fragmentation de petit poids moléculaire induite chez les cellules U-937 par la ricine, la modeccine, la toxine dyphtérique, la toxine de *Pseudomonas* (toutes des toxines qui inhibent la synthèse protéique) est inhibée par des inhibiteurs de sérines protéases telle la DCI (dichloroisocoumarin) (Komatsu *et al.*, 1998; Weaver *et al.*, 1993). Des études précédentes montraient qu'une série d'inhibiteurs de sérines protéases pouvaient moduler l'apoptose dans les cellules en culture ou dans un système acellulaire suite à l'utilisation d'agents qui causent des dommages à l'ADN (Bruno *et al.*, 1992; Ghibelli *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1996; Shimizu *et al.*, 1996; Solary *et al.*, 1996; Weaver *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1996). Par exemple, à de faibles concentrations, la TPCK inhibe la fragmentation de petit poids moléculaire due à différents stimuli apoptotiques (Bruno *et al.*, 1992; Hara *et al.*, 1996) mais, à de fortes concentrations, elle induit l'apoptose chez les monocytes humains THP.1 par la fragmentation de haut poids moléculaire de l'ADN. En outre, cette apoptose induite par la TPCK est complètement inhibée par la z-VAD-fmk (Zhu *et al.*, 1997).

La sérine protéase AP24 est capable d'initier la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN (Wright *et al.*, 1994; 1998).

La sérine protéase PR3 induit l'apoptose des cellules endothéliales avec toutes les caractéristiques morphologiques et la fragmentation de l'ADN liées à la mort

cellulaire programmée. La PR3 est relâchée par les neutrophiles et les monocytes activés (Yang *et al.*, 1996).

De façon intéressante, le CrmA est aussi un puissant inhibiteur de la granzyme B (Quan *et al.*, 1995). Le CrmA inhibe avec grande affinité l'activité enzymatique de la caspase-1 (Ray *et al.*, 1992). Cependant, il devient de plus en plus évident que le CrmA est aussi un puissant inhibiteur d'autres caspases telle la caspase-8 ainsi que d'autres sérine protéases non encore identifiées.

### **1.8 Activation des endonucléases dans l'apoptose**

La fragmentation extensive de l'ADN dans les cellules apoptotiques suggère fortement l'activation d'endonucléases endogènes au cours de l'apoptose. Cependant, cette fragmentation de l'ADN paraît avoir deux composantes: un clivage de l'ADN en fragments de masse moléculaire élevée d'approximativement 200-300 et 45-50 kpb qui représenteraient le clivage de domaines chromosomiques tels les boucles superenroulées et les points d'attache sur la matrice nucléaire (Bruno *et al.*, 1992; Dubrez *et al.*, 1996; Ghibelli *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1996; Oberhammer *et al.*, 1993a; Pandey *et al.*, 1994; Shimizu & Pommier, 1996; Solary *et al.*, 1996; Walker *et al.*, 1994; Weaver *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1996). Il y a ensuite l'apparition de brisures double-brin dans des espaces internucléosomiques et le relâchement de fragments mono- et oligonucléosomiques qui forment une échelle

caractéristique suite à une électrophorèse en gel d'agarose standard (Wyllie, 1980; Wyllie *et al.*, 1984).

Des études biochimiques récentes avaient démontré que suite à l'induction de l'apoptose, la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine dépendaient d'une protéine nucléaire (Samejima & Earnshaw, 1998) hétérodimérique formée de deux sous-unités, le Dff45/Icad et le Dff40/Cad/Cpan. Le Dff40/Cad/Cpan possède une activité nucléolytique intrinsèque mais doit fonctionner de concert avec le Dff45/Icad pour générer son activité nucléolytique du fait que celui-ci contribue à le stabiliser et à le localiser correctement dans la chromatine. Le Dff40/Cad/Cpan est composé d'un domaine C-terminal catalytique et d'un domaine de régulation en position N-terminale. La délétion du domaine catalytique abolit l'induction par la caspase-3 de l'activité nucléolytique du Dff40/Cad/Cpan et non son habileté à interagir avec le Dff45/Icad. Cependant, la délétion de la région régulatrice génère un Dff40/Cad/Cpan avec une activité nucléolytique constitutive mais qui n'interagit plus avec le Dff45/Icad ni ne nécessite la caspase-3 pour être activé (Inohara *et al.*, 1999). Suite à l'induction de l'apoptose, le Dff45/Icad est clivé par la caspase-3 aux acides aminés 117 et 224 et se dissocie du Dff40/Cad/Cpan qui recouvre son activité nucléolytique (Enari *et al.*, 1998; Halenbeck *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1997; 1998; Sakahira *et al.*, 1998). On a montré également que la surexpression du Dff45/Icad inhibe l'activité nucléolytique endogène (Enari

*et al.*, 1998; Sakahira *et al.*, 1998). Chez les souris mutantes portant une délétion des trois premiers exons du gène du Dff45/Icad, l'activité nucléolytique du Dff40/Cad/Cpan est abolie. De plus, les cellules mutantes deviennent résistantes à la fragmentation de l'ADN et à la condensation de la chromatine induites par les stimuli apoptotiques. Il faut souligner que le complexe Dff45/Dff40 a une activité nucléolytique faible, pour ne pas dire nulle, sur de l'ADN nu même, en présence de la caspase-3 activée, contrairement à celle qu'on observe sur des noyaux purifiés (Enari *et al.*, 1998; Halenbeck *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998). Il y a donc d'autres facteurs nucléaires impliqués dans la stimulation de l'activité du complexe. Un de ces facteurs est la HMG2 "*high mobility group protein 2*" qui augmente l'activité du complexe, probablement en facilitant son association avec l'ADN chromosomique par la création de changements structuraux particuliers qui stabilisent le complexe Dff-ADN (Toh *et al.*, 1998). Il y a aussi l'AIF "*apoptosis-inducing factor*" qui est libéré par les mitochondries vers le noyau lors de l'apoptose. L'AIF suffit à induire la condensation de la chromatine dans des noyaux purifiés et la fragmentation de haut poids moléculaire de l'ADN (Susin *et al.*, 1999b). L'apparition d'aucune de ces caractéristiques de l'apoptose n'est bloquée par la z-VAD-fmk, l'inhibiteur à large spectre des caspases (Susin *et al.*, 1999b).

Une nouvelle nucléase de 97 kDa,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  - dépendante, capable d'induire la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN a été caractérisée (Pandey *et al.*, 1997). Cette nucléase, présente dans une variété de lignées cellulaires et de

tissus de rat, existe sous des formes multiples aux points isoélectriques variant entre 4.6 et 5.0. *In vitro*, cette nucléase démontre des activités endo- et exonucléolytiques et elle induit à la fois des brisures simple et double brin dans l'ADN (Pandey *et al.*, 1997).

Récemment, une nucléase apoptique, l'AN34, a été purifiée et caractérisée. Cette nucléase dépend du  $Mg^{2+}$  et a été isolée de cellules HL-60 induites à entrer en apoptose par l'étoposide (Yoshida *et al.*, 1998a). L'AN34 introduit des brisures double et simple brin dans l'ADN de SV40 et induit la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN sur des noyaux isolés de cellules HL-60 non traitées. Une caractéristique importante de l'AN34 est la production d'extrémités 3'-OH étant donné qu'il a été établi que les terminaisons 5'-P et 3'-OH sont produites pendant l'apoptose (Gavrieli *et al.*, 1992). Une autre caractéristique de l'AN34 est de produire prédominairement des brisures simple brin et cela en conformité avec la découverte que de nombreuses brisures simple brin étaient générées dans les régions internucléosomiques de l'ADN durant l'apoptose (Peitsch, 1993; Walker *et al.*, 1997).

Torriglia *et al* (1998) ont décrit l'existence de la L-DNase II comme molécule qui fait la transition entre les protéases et les endonucléases lors de l'apoptose. Cette nucléase provient de la serpine LEI "*leukocyte elastase inhibitor*" suite à une modification post-traductionnelle qui implique un changement de poids

moléculaire du LEI (Torriglia *et al.*, 1998). Les auteurs proposent que la fonction du LEI est d'empêcher la cascade protéolytique de l'apoptose dans les cellules vivantes. Après la modification post-traductionnelle qui le transforme en nucléase, l'inhibition de la cascade protéolytique est levée et la dégradation nucléaire est induite dans les cellules apoptotiques (Torriglia *et al.*, 1998).

Une nucléase de 18 kDa (NUC18) a été purifiée et identifiée chez des thymocytes de rats induits à entrer en apoptose par des glucocorticoïdes. Cette nucléase est calcium-dépendante et induit la fragmentation apoptotique de l'ADN (Montague *et al.*, 1994). Cependant, quand la NUC18 est ajoutée à des noyaux purifiés elle n'induit pas les fragmentations de haut et de petit poids moléculaire caractéristiques de l'apoptose (Hughes & Cidlowski, 1997). La question demeure donc ouverte quant au véritable rôle joué par cet enzyme dans l'apoptose.

Par ailleurs, on a décrit une nucléase de 50 kDa chez les cellules U937 induites à entrer en apoptose par l'étoposide. L'activité de cette protéine cytosolique induit les changements morphologiques et la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN, typiques de l'apoptose, sur des noyaux purifiés (Montague *et al.*, 1994).

La DNase II purifiée à partir des cellules CHO "*Chinese hamster ovary*" induit la condensation de la chromatine et la dégradation génomique quand elle est surexprimée dans ces cellules. Cette DNase, qui est normalement localisée dans le cytoplasme, transite vers le noyau avant la dégradation de l'ADN (Krieser & Eastman, 1998).

### **1.9 Objectifs du projet**

Beaucoup d'études ont démontré l'implication directe des caspases dans la régulation de l'apoptose (Alnemri, 1997; Alnemri *et al.*, 1995; Cryns & Yuan, 1998; Enari *et al.*, 1995a,b; 1996; 1998; Hengartner *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1997; Stennicke & Salvesan, 1997; 1998; Thornberry, 1998; Thornberry & Molineaux, 1995; Thornberry *et al.*, 1997; Yuan, 1993; Yuan & Horvitz, 1992). Ces caspases agissent comme régulateurs positifs ou régulateurs négatifs (caspase-2s) dans différents types d'apoptose.

La cascade protéolytique des caspases est activée en réponse à divers stimuli incluant les drogues anticancéreuses pour aboutir à l'éradication systématique et ordonnée de la cellule.

Le rôle et la fonction des caspases suite à un traitement avec les drogues anticancéreuses ne sont pas encore totalement élucidés mais plusieurs évidences suggèrent que leur expression pourrait être critique pour la sensibilité ou la résistance au traitement chimiothérapeutique des cancers (Faleiro *et al.*, 1997;

Kuida *et al.*, 1995; 1996; 1998; Martins *et al.*, 1997a; Perkins *et al.*, 1998; Varfolomeev *et al.*, 1998).

Le but premier du projet est d'étudier le rôle de la voie des caspases et de la voie CrmA/TPCK-sensible impliquées dans la fragmentation de haut et de petit poids moléculaire de l'ADN suite au traitement de différentes lignées cellulaires avec la CPT.

Le second objectif du projet est dédié à l'identification et la caractérisation des constituants actifs contenus dans le système acellulaire après traitement des cellules avec la CPT, et qui sont responsables des fragmentations de haut et de petit poids moléculaire de l'ADN.

Enfin, la troisième partie du projet consiste à définir le devenir des cellules traitées à la CPT en présence d'inhibiteurs des activités des caspases et des activités TPCK-sensibles, notamment par l'étude des points de contrôle du cycle cellulaire et le mécanisme de mort cellulaire.



## CHAPITRE 2 - RÉSULTATS

**2.1 The CrmA- and TPCK-sensitive pathways that trigger the oligonucleosome-sized DNA fragmentation in camptothecin-induced apoptosis; relation to caspase activation and high molecular weight DNA fragmentation (Biochem. Cell Biol. 75: 359-368, 1997).**

Sané, A.T. , Schmitt, E., Steyaert, A., Meyer, D., and Bertrand, R.<sup>(1)</sup>

Louis-Charles Simard Research Center, Montreal Cancer Institute, Notre-Dame Pavilion, CHUM, Montreal (Que) H2L 4M1 Canada

(1) To whom correspondence should be addressed; Louis-Charles Simard Research Center, Montreal Cancer Institute, Room Y-5634, Notre-Dame Pavilion, CHUM, 1560 Sherbrooke St. East, Montreal (Que) H2L 4M1 Canada.

Phone: (514) 281 6000 ext 6615

Fax: (514) 896 4689

Email: [bertranr@ere.umontreal.ca](mailto:bertranr@ere.umontreal.ca)

**ABSTRACT**

In human B lymphoma Namalwa variant cells expressing the serpin-like CrmA protein, the kinetic of oligonucleosome-sized DNA fragmentation is retarded compared to that of control Namalwa cells following camptothecin treatment. However, no difference in kinetics of high molecular weight DNA fragmentation is observed between the two lines after camptothecin. Similar delay and inhibition of the oligonucleosome-sized DNA fragmentation was observed in human B lymphoma Namalwa and monocytic-like leukemia U-937 cells coincubated in the presence of various concentrations of N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethylketone and camptothecin. The effect of N-tosyl-L-phenylalanine was similar to that of CrmA and did not prevent the appearance of high molecular weight DNA fragments. Similar suppression of camptothecin-induced internucleosomal DNA fragmentation was also observed in a cell-free system when cytosolic extracts obtained from camptothecin-treated Namalwa and U-937 cells are coincubated with untreated nuclei in the presence of N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethylketone. Furthermore, N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethylketone had no significant effects on caspase 3-like activities in camptothecin-treated Namalwa and U-937 cells. Hydrolysis of Ac-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-methylcoumarin, a fluorogenic substrate of caspase 3-like activities, was detected in extracts prepared from camptothecin-treated Namalwa and U-937 cells with no apparent difference in the time

courses of caspase 3-like activation in the absence or presence of N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethylketone. Similarly, N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethylketone is a weak inhibitor of caspase 3-like activities *in vitro*.

Taken together, these observations suggest that the N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethylketone-sensitive pathway is involved in camptothecin-induced oligonucleosome-sized DNA fragmentation. Furthermore, inhibition of this pathway has no effect on caspase 3-like activation and on the occurrence of high molecular weight DNA fragmentation.

*Key words:* CrmA, N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethylketone, camptothecin, DNA fragmentation, apoptosis.

## RESUME

Dans les lymphomes B humains Namalwa qui expriment la protéine virale CrmA, la cinétique de la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN est retardée par rapport aux cellules Namalwa contrôles après traitement à la camptothécine. Cependant, aucune différence dans la cinétique de la fragmentation de haut poids moléculaire de l'ADN n'est observée entre les deux lignées cellulaires suite au traitement à la camptothécine. Un délai similaire dans l'apparition de la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN a également été observé chez les cellules Namalwa et les cellules monocytocytocémiques U-937 lorsque les cellules sont co-incubées en présence de concentrations variées de N-tosyl-L-phénylalanine chlorométhylketone et de camptothécine. La N-tosyl-L-phénylalanine ne modifie pas la fragmentation de haut poids moléculaire de l'ADN et semble avoir un effet similaire à celui de CrmA. Cette inhibition de la fragmentation internucléosomique de l'ADN a aussi été observée dans un système acellulaire lorsque des extraits cytosoliques de cellules Namalwa ou U-937 traitées à la camptothécine sont co-incubés avec des noyaux de cellules contrôles en présence de N-tosyl-L-phénylalanine chlorométhylketone. De plus la N-tosyl-L-phénylalanine chlorométhylketone ne semble pas affecter l'activité de caspase 3 dans les cellules Namalwa et U-937 traitées. La cinétique d'hydrolyse du substrat fluorogénique de caspase 3,

l'Ac-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-methyl coumarin, a été mesurée dans des extraits cytosoliques de cellules Namalwa et U-937 traitées à la camptothécine et l'activité de caspase-3 ne semble pas modifiée en présence ou en absence de N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethylketone. *In vitro* également, la N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethylketone n'est qu'un faible inhibiteur de l'activité de caspase 3. Ces observations suggèrent que la voie d'activation N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethylketone sensible est impliquée dans la fragmentation internucléosomique de l'ADN induite par la camptothécine et que cette voie est indépendante de la fragmentation de haut poids moléculaire de l'ADN et de l'activation des caspase 3-like.

*Mots clés* : CrmA, N-tosyl-L-phenylalanylchloromethylketone, camptothecin, DNA fragmentation, apoptosis.

## INTRODUCTION

Programmed cell death (apoptosis) is a pivotal biological process regulating cell survival and cell death (Ellis et al., 1991; Raff et al., 1994; Thompson, 1995; Wyllie, 1992;Wyllie, 1987). Apoptosis plays a central role during embryonic development, differentiation of the lymphoid cells and cell homeostasis. Defective control of apoptosis is associated with various human disorders such as cancer development, neurodegenerative and immunosuppressive diseases (Ameisen et al., 1995; Carson and Ribeiro, 1993; Korsmeyer, 1995; Pantaleo and Fauci, 1995; Reed, 1994; Thompson, 1995). A variety of physiological and non-physiological signals trigger apoptosis in sensitive cells. Signals emerging from cell death receptors such as the CD95/Fas (FASR) and Tumor Necrosis Factor type 1 receptors (TNFR1) can trigger apoptosis in a variety of cell types following binding of their respective ligands (Dhein et al., 1995; Golstein et al., 1995; Nagata S and Golstein P, 1995; Suda and Nagata, 1994; Tewari and Dixit, 1995). Cytotoxic T-lymphocytes can also mediate apoptosis via secretion of serine proteases such as Granzyme B (Berke, 1995; Greenberg, 1996). Anticancer drugs like DNA topoisomerase I (top 1) and II (top 2) inhibitors induce also apoptosis in various human cancer cell lines (Barry et al., 1990; Bertrand et al., 1991; Bertrand et

al., 1993; Del Bino and Darzynkiewicz, 1991; Jaxel et al., 1988; Kaufmann, 1989; Solary et al., 1993; Walker et al., 1991).

CrmA (Cytokine response modifier Activity) is a *Cowpox virus* protein that modifies the host inflammatory response by decreasing interleukin-1 $\beta$  production (Ray et al., 1992) through its inhibitory effect on caspase 1 activity (Ray et al., 1992; Yuan, 1993). More recently, it has been observed that CrmA is also a potent inhibitor of apoptosis activated via FASR and TNFR1 as well as Granzyme B-induced apoptosis. (Quan et al., 1995; Tewari and Dixit, 1995). CrmA inhibits with high affinity the enzymatic activity of caspase 8 (Boldin et al., 1996; Fernandez-Alnemri et al., 1996; Muzio et al., 1996; Zhou et al., 1997) that binds FASR and TNFR1 receptors via FADD and TRAFF adapter proteins (Nagata, 1997) and potently inhibits the serine protease Granzyme B (Quan et al., 1995). Although the mechanisms by which signals emerging from DNA damaging agents such as DNA topoisomerase inhibitors are translated into activation of apoptosis are not elucidated yet, several evidences indicate now that trypsin-like and caspase 3 (Fernandes-Alnemri et al., 1994; Nicholson et al., 1995; Tewari et al., 1995) and caspase 6 activities (Fernandes-Alnemri et al., 1995) are involved in the cell death machinery following DNA topoisomerase I and II inhibitor treatment (Bruno et al., 1992; Dubrez et al., 1996; Ghibelli et al., 1995; Hara et al., 1996; Martins et al., 1997; Schmitt et al., 1997; Schmitt et al., 1997; Shimizu and Pommier, 1996; Solary et al., 1996; Weaver et al., 1993; Yoshida et al., 1996). The trypsin-like protease activities

detected in apoptosis following DNA topoisomerase inhibitors are not identified yet. Early studies showed that series of serine protease inhibitors blocked the low molecular weight DNA fragmentation associated with apoptosis induced by DNA topoisomerase inhibitors (Bruno et al., 1992; Weaver et al., 1993). More recently, active serine proteases that trigger low-molecular weight DNA fragmentation in a cell-free system have been detected in extracts obtained from DNA topoisomerase inhibitors treated cells. From these studies, it has been suggested that DNA topoisomerase inhibitors activate serine proteases which in turn activate a pathway involved in low-molecular weight DNA fragmentation (Ghibelli et al., 1995; Hara et al., 1996; Shimizu and Pommier, 1996; Solary et al., 1996; Yoshida et al., 1996). More recently, it has been also reported that a dichloro-isocoumarin-sensitive pathway may lead to low molecular weight DNA fragmentation in U-937 cells following VP16 (Dubrez et al., 1996) , while a trypsin-like protease activity was proposed to activate apoptosis following camptothecin (CPT) treatment in an hepatoma cell line (Adjei et al., 1996). Others have reported the purification of a novel serine protease AP24 that is also activated in leukemic cells undergoing apoptosis (Wright et al., 1994).

In this study, we show that expression of CrmA in human B lymphoma Namalwa cells delays the appearance of oligonucleosome-sized DNA fragmentation following short CPT treatment without interfering with the occurrence of high molecular weight DNA fragmentation. The effect of CrmA



is similar to the one observed using low concentration N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethylketone (TPCK) in two cell lines, suggesting the presence of CrmA and TPCK-sensitive pathways involved in the oligonucleosome-sized DNA fragmentation following CPT treatment. Neither CrmA nor TPCK inhibit the activation of caspase 3-like in these cells and do not interfere with the appearance of high molecular weight DNA fragmentation. Taken together these results suggest that internucleosomal DNA cleavage and higher order DNA fragmentation are triggered by two independent pathways in the apoptotic process induced by camptothecin.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Chemicals.** The radioactive precursor [2-<sup>14</sup>C]-thymidine (59 mCi/mmol) was obtained from ICN BioMedicals (Costa Mesa, CA). 20-S-camptothecin lactone (CPT) were purchased from Sigma Chemicals Co. (St-Louis, MO) and dissolved in dimethyl-sulphoxide (at 10 mmol/l) prior to each experiment. The protease inhibitor N-tosyl-L-phenylalanylchloromethyl ketone (TPCK) was purchased from Sigma. The peptide derivatives Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO (Ac-DECD-CHO) and Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-CHO (Ac-YVAD-CHO) and the fluorogenic peptide derivatives Ac-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) and 4-(4-dimethyl-aminophenylazo)benzoyl-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Val-5-[(2-amino-ethyl) amino]- naphthalene-1-sulfonic acid

(DABCYL-YVADAPV-EDANS) were purchased from Bachem Bioscience Inc. ( King of Prussia, PA). All other chemicals were of reagent grade and purchased either from Sigma, ICN and Boehringer-Mannheim or from other local sources.

**Cell culture, DNA labeling and drug treatment.** The human Namalwa and U-937 cell lines obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Md), were grown in suspension culture at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 ug/ml streptomycin. Cell culture products were purchased from Gibco-BRL Life Technologies (Grand Island, NY). For DNA labeling, cells were grown with [<sup>14</sup>C]-thymidine (0.02 uCi/ml) for 24 h and then chased in isotope-free medium overnight prior to drug treatment.

**CrmA transfection and expression.** The expression vector pCDNA3 containing the coding sequences of CrmA was provided generously by Drs V.M. Dixit and M. Tewari from the Dept. of Pathology, University of Michigan Medical Scholl (Ann Arbor, MI). Purified vector was transfected in Namalwa cells by electroporation at 0.27 kVolts (Gene Pulser, BioRad, Hercules, CA). Transfected cells were grown under neomycin selection at 250 ug/ml to obtain a stable variant line prior to perform the experiments. CrmA

expression was monitored by immunodetection using polyclonal anti-CrmA antibodies provided by Dr. J. Yuan, Cardiovascular Research Center, Massachusetts General Hospital-East (Charlestown, MA) (not shown).

**DNA filter elution assay.** The DNA filter elution assay was designed to monitor and quantitate DNA fragmentation associated with apoptosis (Bertrand et al., 1995; Bertrand and Pommier, 1995; Bertrand et al., 1991; Bertrand et al., 1993). Each sample (approximately  $0.5 \times 10^6$  [ $^{14}\text{C}$ ]-thymidine-labeled cells) is loaded onto a protein-adsorbing filter (vinyl/acrylic copolymers filters, Metrical membrane, 0.8  $\mu\text{m}$  pore size, 25 mm diameter, Gelman Sciences Inc., Ann Arbor, MI) mounted in a Millipore filter holder connected to a 50 ml syringe (see figure in ref. (Bertrand et al., 1995; Bertrand and Pommier, 1995)). Cells are then washed with 5 ml of phosphate buffered saline (PBS). As soon as the washing solution has dripped through, lysis is performed with 5 ml of lysis solution containing 0.2% sodium sarkosyl - 2 M NaCl - 0.04 M EDTA, pH 10.0. After the lysis solution has dripped through by gravity, the filter is washed with 5 ml of 0.02M EDTA (pH 10.0). The filter is then processed as described (Bertrand et al., 1995; Bertrand and Pommier, 1995; Bertrand et al., 1991; Bertrand et al., 1993). Radioactivity was counted by liquid scintillation spectrometry in each fraction (loading wash, lysis, EDTA wash, filter). DNA fragmentation was determined as the fraction of DNA in the loading wash fraction + lysis fraction + EDTA wash fraction relative to total

DNA (loading wash + lysis + EDTA wash + filter). Results are expressed as the percentage of DNA fragmented in treated cells compared to DNA fragmented in control untreated cells (background) using the formula:

$$(F-F_0/1-F_0) \times 100$$

where F and F<sub>0</sub> represent DNA fragmentation in treated and control cells, respectively.

**Analysis of DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis.** To visualize the oligonucleosome-sized DNA fragments, at specified times after drug treatment, cellular DNA was extracted by a salting-out procedure as described previously (Miller et al., 1988). Electrophoresis was performed in 1.6% agarose gel in Tris-borate buffer (pH 8.0) at 2.5 volt / cm for 15 h. Following electrophoresis, DNA was visualized by ethidium bromide staining. High-molecular weight DNA fragments were analysed by Transverse Alternating Pulsed Field Electrophoresis (TAPFE) in a Beckman GeneLine™ apparatus (Beckman Instruments, Inc Paolo Alto, CA). Briefly, agarose blocks containing untreated and CPT-treated cells were prepared at specified times following drug treatment by standard methodology. Plugs were incubated for 24 h at 42°C in a solution containing 1.0 mg / ml proteinase K or 100 ug / ml pronase, 1% N-lauryl-sarcosine, 0.2% sodium deoxycholate and 100 mM EDTA (pH 8.0). The agarose-embedded DNA was equilibrated in TE buffer pH 8.0 (20 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA) prior to electrophoresis on a 1.2% agarose gel. Gels were

subjected to a 30 min run at 170 volts with a pulse time of 4 sec, followed by a 24 h run at 150 volts with a pulse time of 60 sec. Electrophoresis were performed at 18°C in TAFE buffer according to the manufacturer instruction manual. Following electrophoresis, DNA was visualized by ethidium bromide staining.

**Cell-free system.** Cytosolic extracts and isolated nuclei were prepared by washing control and treated cells twice by centrifugation/resuspension in 10 ml ice-cold PBS (without  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{Mg}^{++}$ ) and incubating cells on ice for 10 min at a density of  $1.0 \times 10^7$  cells / ml in a lysis buffer containing 10 mM Hepes (pH 7.4), 20 mM NaCl, 80 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 0.15 U/ml aprotinin, 10% glycerol and 0.1% NP-40. Samples were then centrifuged (2,000g for 10 min at 4°C) and supernatants collected as cytoplasmic fractions. Pellets (nuclei) were then washed twice by centrifugation/resuspension in the lysis buffer without detergent. Cytoplasm extracts from untreated or treated cells were then incubated with isolated nuclei from labeled untreated cells at 30°C for 30 min in the absence or presence of putative inhibitors and DNA fragmentation was then measured by DNA filter elution assays as described above (Bertrand et al., 1995; Bertrand and Pommier, 1995; Bertrand et al., 1991; Bertrand et al., 1993).

**Caspase activity determination.** Cytosolic extracts were prepared by washing control and treated cells twice by centrifugation/resuspension in 10 ml ice-cold PBS (without  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{Mg}^{++}$ ) and incubating on ice for 10 min at a density of  $1.0 \times 10^7$  cells / ml in a lysis buffer containing 100 mM Hepes (pH 7.4), 20 % glycerol, 5 mM EGTA, 5 mM DTT and 0.1% NP-40. Samples were then centrifuged (2,000g for 10 min at 4°C) and supernatants collected as cytosolic extracts. Caspase activities were measured by monitoring fluorescence continuously in a dual luminescence fluorometer (LS 50B Perkin Elmer) using excitation wavelength of 360 nm and emission wavelength of 490 nm for the substrate DABCYL-YVADAPV-EDANS and excitation wavelength of 380 nm and emission wavelength of 460 nm for Ac-DEVD-AMC. Reactions were carried out in cuvettes and the temperature was maintained at 37° using a water-jacketed sample compartment. The assay mixture contained 100 mM Hepes (pH 7.4), 20% (v/v) glycerol, 5 mM DTT , 5mM EDTA and 200 uM fluorogenic peptides. Enzyme activities were determined as initial velocities and expressed as relative intensity / min / mg.

## RESULTS

**Effect of CrmA on camptothecin-induced oligonucleosome-sized and high molecular weight DNA fragmentation.** To test whether CrmA expression would modulate camptothecin-induced apoptosis in human cancer cells, DNA fragmentation was first measured in control and transfected Namalwa cells expressing CrmA and in U-937 cells using a DNA filter elution assay. The DNA filter elution assay that we routinely perform to monitor DNA fragmentation associated with apoptosis, was used to monitor and quantitate kinetics of DNA fragmentation in cells undergoing apoptosis (Bertrand et al., 1995; Bertrand and Pommier, 1995; Bertrand et al., 1991; Bertrand et al., 1993). CrmA expression in Namalwa cells only partially modulates the extent of DNA fragmentation following CPT treatment, a DNA topoisomerase I inhibitor (Fig 1). Short treatments (30 min) with CPT at 1.0  $\mu$ M induced apoptosis in Namalwa and U-937 cells with detectable DNA fragmentation as soon as 2 h after drug treatment. In contrast, no appearance of DNA fragmentation could be detected 2 h after CPT treatment in the transfected Namalwa cells. In these cells, DNA fragmentation starts slowly to begin only 4 h after CPT treatment and then increased linearly with time. These results indicate that CrmA expression partially delays the appearance of low-molecular weight DNA fragmentation following CPT treatment. To characterize further

the effect of CrmA on DNA fragmentation, the oligonucleosome-sized DNA fragments and high-molecular weight DNA fragmentation were monitored and visualized by standard agarose gel electrophoresis and Transverse Alternating Pulsed Field Electrophoresis (TAPFE), respectively (Fig 2). Control and transfected Namalwa cells were treated with CPT for 30 min (1.0  $\mu$ M) and at selected times following drug treatment, total DNA was extracted for agarose gel electrophoresis and agarose-embedded DNA prepared for TAPFE. The oligonucleosome-sized DNA fragmentation was visualized following agarose gel electrophoresis and appeared to be retarded in Namalwa cells expressing CrmA. In contrast by TAPFE, no difference in kinetic of high-molecular DNA fragmentation was observed between the two lines. The high-molecular weight DNA fragments were predominantly around 45-50 kbp in both cell lines, although higher molecular weight DNA fragments (> 600 to 700 kbp) are seen in early time points following CPT treatment in both cell lines. Transient appearance of DNA bands > 600 kbp has been reported previously to coincide with DNA-protein complex formation induced by DNA topoisomerase inhibitors and are reversible after drug removal (Beere et al., 1995; Beere et al., 1996; Rusnak et al., 1996). These high-molecular weight DNA fragments of > 600 kbp are not involved as an initial phase of DNA fragmentation occurring during apoptosis but appear to be specific damages emerging from DNA topoisomerase inhibitors that would provide signals for the initiation of apoptosis (Beere et al., 1995; Beere et al., 1996; Rusnak et al., 1996). These



observations imply that CrmA had no effect on the initial DNA damage induced by DNA topoisomerase in these cells. Furthermore, CrmA did not inhibit enzymatic pathway leading to the 45-50 kpb DNA fragments. Instead our results suggest that CrmA partially inhibits unknown activities yet, that are involved in pathways triggering the oligonucleosome-sized DNA fragmentation following CPT treatment.

**Effect of TPCK on camptothecin-induced oligonucleosome-sized and high molecular weight DNA fragmentation.** Inhibition of oligonucleosome-sized DNA fragmentation using serine protease inhibitors has been reported previously (Bruno et al., 1992; Dubrez et al., 1996; Ghibelli et al., 1995; Hara et al., 1996; Shimizu and Pommier, 1996; Solary et al., 1996; Weaver et al., 1993; Yoshida et al., 1996). To analyze and compare further the effect of TPCK in these cells to that of CrmA, Namalwa cells were treated with CPT for 30 min (1.0  $\mu$ M) in the presence of various concentrations of TPCK and at selected time following drug treatment, total DNA was extracted or agarose-embedded DNA prepared for electrophoresis (Fig 3). At low concentration (0.1  $\mu$ M), TPCK delays for 4 hours the appearance of oligonucleosome-sized DNA fragmentation induced by camptothecin in Namalwa cells. At higher concentrations (2.5 and 10  $\mu$ M), TPCK completely abrogates the oligonucleosome-sized DNA fragmentation for at least 8 h in Namalwa cells. Similarly, 10  $\mu$ M TPCK completely blocks the oligonucleosome-sized DNA

fragmentation induced by camptothecin in U-937 cells. However, even at the highest concentration (10  $\mu$ M), TPCK has no inhibitory effect on the occurrence of high molecular weight DNA fragmentation in the Namalwa and U-937 cells (Fig 3; lower panels). The effects of TPCK in these lines are similar to the ones observed in Namalwa cells expressing CrmA following CPT treatment. Specifically at low concentration, TPCK does not completely abrogate the oligonucleosome-sized DNA fragmentation but delays significantly its kinetic of appearance as does CrmA. These results may suggest that CrmA inhibits a TPCK-sensitive pathway involved in the oligonucleosome-sized DNA fragmentation. CrmA is a cross-class inhibitor; the potency of CrmA to inhibit putative serine proteases has been described at least with Granzyme B (Quan et al., 1995) as well as its inhibitory effect on cysteine proteases such as caspase 1 and 8 (Zhou et al., 1997).

To investigate further the effect of CrmA and TPCK upon CPT-induced oligonucleosome-sized DNA fragmentation, we next used a cell-free system that we have developed previously. This cell-free system was designed to elucidate the biochemical pathways of apoptosis and has been proven convenient to measure and detect protease activities in cytosolic extracts prepared from cells undergoing apoptosis. These activated extracts trigger the oligonucleosome-sized DNA fragmentation when incubated with isolated nuclei obtained from control untreated cells (Bertrand et al., 1995; Bertrand et al., 1994; Shimizu and Pommier, 1996; Solary et al., 1993). Recently, the

presence of active TPCK-sensitive proteases involved in DNA fragmentation following DNA topoisomerase inhibitor treatment has been revealed using this assay (Dubrez et al., 1996; Shimizu and Pommier, 1996; Solary et al., 1996).

Cytosolic extracts prepared 1 h after drug treatment show no activity in the cell-free system consistent with lack of detectable DNA fragmentation induced by CPT in cultured cells. However the cytosolic extracts of CPT-treated Namalwa and U-937 cells prepared 2 h and 4 h after drug treatment are able to trigger DNA fragmentation when incubated with isolated control nuclei in the cell-free system (Fig 4). Activities in those extracts are inhibited predominantly by TPCK. These results indicate that TPCK-sensitive proteases are activated at early phase of apoptosis following CPT consistent with other reported observations (Ghibelli et al., 1995; Hara et al., 1996; Shimizu and Pommier, 1996; Solary et al., 1996; Yoshida et al., 1996). Early activation of TPCK-sensitive activity in the cell-free system, also correlate with the appearance of oligonucleosome-sized DNA fragmentation in cultured cells.

In contrast, cytosolic extracts prepared after 1h, 2h and 4 h from CPT-treated Namawa cells expressing CrmA showed very low level of activity that promotes DNA fragmentation in the cell-free system (Fig 4). These results are consistent with the protective effect conferred by CrmA upon low molecular weight DNA fragmentation in cultured CPT-treated Namalwa/CrmA cells. These results suggest also that CrmA potently inhibits an activity that would otherwise promote DNA fragmentation. In the active 6 h extracts from

Namalwa-CrmA cells activity that was also predominantly inhibited by TPCK was detected (data not shown). Using a similar cell-free system Lazebnik *et al.* have previously shown that neither PARP, Lamin A and B cleavage were inhibited in the presence of TPCK in their cell-free system extracts (Lazebnik *et al.*, 1995). Our results with those of Lazebnik *et al.* indicate that the TPCK-sensitive activities detected in cell-free system are not related to caspase 3 and 6 activities, the caspases involved in PARP and lamin cleavage.

#### **Effect of CrmA and TPCK on caspase activation following CPT treatment.**

A series of cysteine proteases or caspases are involved in the apoptotic process (Alnemri *et al.*, 1996; Kumar and Harvey, 1995; Patel *et al.*, 1996). Their activities are likely associated with the process of cell death itself. In initial phase of apoptosis triggered by FASR and TNFR1, studies have shown sequential activation of caspases (Enari *et al.*, 1996). To determine the effect of CrmA and TPCK on caspase activities in CPT-treated cells, we monitored caspase 1-like and caspase 3-like activities using the specific fluorogenic peptide substrates DABCYL-YVADAPV-EDANS and Ac-DEVD-AMC, respectively (Fig 5).

In cytosolic extracts of CPT-treated cells, caspase 3-like activity increased significantly after drug treatment with peak activity around 4 h after CPT treatment. No significant difference in caspase 3-like activation was observed between Namalwa cells, transfected Namalwa cells with CrmA and TPCK-

treated Namalwa cells following CPT treatment (Fig 5; left panel). No hydrolysis of DABCYL-YVADAPV-EDANS was detected treatment in these cells following CPT (data not shown). These results indicated that caspase 1 is neither activated nor involved in the apoptotic process induced by CPT and that CrmA and TPCK had no significant effect on the processing and activity of caspase 3 in these cells. Similar results were obtained in U-937 cells (Fig 5; middle panel). To validate these observations, the effect of TPCK on caspase 3-like activity was monitored *in vitro*. Various concentrations of TPCK were directly added to active extracts and initial velocities of caspase 3-like activities were measured. As shown in the right panel (Fig 5), TPCK has only a slight inhibitory effect on caspase 3-like activity *in vitro* while the tetrapeptide derivative Ac-DEVD-CHO completely inhibit these activities.

## DISCUSSION

The mechanisms by which particular agents trigger the apoptotic response of tumor cells have become a subject of intense study. Although, apoptotic cells undergo similar cellular and nuclear changes following physiological and non-physiological induction, it is clear now that the mechanisms by which these changes occurred, vary depending of the stimuli that trigger apoptosis. The antitumor activity and primary mechanism of action of DNA topoisomerase inhibitors have been the focus of a large number of reports including some

reviews (Liu, 1989; Pommier and Kohn, 1989; Pommier et al., 1994; Pommier and Tanizawa, 1993). Antitumor drugs that interfere with mammalian top 1 or 2 do so by stabilizing a transient intermediate of the topoisomerase reactions. These drugs trap covalently linked topoisomerase-DNA complexes associated with single- or double-strand DNA breaks (Liu, 1989; Pommier and Kohn, 1989; Pommier et al., 1994; Pommier and Tanizawa, 1993). Drug-induced stabilization of topoisomerase-linked DNA strand breaks has been recognized as the primary mechanism of action of topoisomerase inhibitors. Formation of cleavable-complexes appears to be responsible for the antitumor activity rather than topoisomerase inhibition by itself. Studies using resistant cell lines also supported the concept that formation of cleavable-complexes is essential for cell killing (Liu, 1989; Pommier and Kohn, 1989; Pommier et al., 1994; Pommier and Tanizawa, 1993). However, the rapidly reversible nature of these lesions after drug removal strongly suggests that drug trapping of topoisomerase-DNA complexes may be necessary but not sufficient for cell killing and that cell death results from further irreversible DNA lesions and from the induction of intracellular signals or responses leading to cell death. DNA topoisomerase 1 and 2 inhibitors are able in various cell lines to trigger cell death by rapidly inducing the cellular morphological changes, high molecular weight DNA fragmentation and oligonucleosome-sized secondary DNA fragmentation typical of apoptosis (Barry et al., 1990; Bertrand et al., 1991; Bertrand et al., 1993; Del Bino and Darzynkiewicz, 1991; Jaxel et al.,

1988; Kaufmann, 1989; Solary et al., 1993; Walker et al., 1991). The mechanisms involved in low and high molecular DNA fragmentation are unclear, but several observations including ours indicated that the high molecular weight and extensive oligonucleosome-sized DNA fragmentation are triggered by two independent mechanisms in cell treated with camptothecin, a DNA topoisomerase 1 inhibitor.

Several biochemical events that contribute to apoptotic cell death have recently been elucidated in mammalian cells. Apoptosis triggering by various stimuli involves cytosolic proteolytic cascades. An emerging family of caspases or Ced-3/Ice-like cysteine proteases has been identified and were proposed to be a pivotal trigger of apoptosis and several studies have revealed the importance of the caspases in executing the process of cell death itself (Alnemri et al., 1996; Kumar and Harvey, 1995; Patel et al., 1996).

Active serine proteases were proposed also to play an essential role in apoptosis induced by DNA topoisomerase inhibitors (Bruno et al., 1992; Ghibelli et al., 1995; Hara et al., 1996; Shimizu et al., 1996; Solary et al., 1996; Weaver et al., 1993; Yoshida et al., 1996). Moreover, a recent report indicated that in the hepatocellular carcinoma Hep 3B cells, apoptosis is induced by CPT without activation of the proteolytic caspase cascade involved in PARP and lamin B cleavage and that a trypsin-like protease activity appeared to activate apoptosis in these cells (Adjei et al., 1996). Other serine protease as the well known Granzyme B is able to activate apoptosis via a proteolytic cascade in instance of

apoptosis mediated by cytotoxic T lymphocytes in targeted cells (Berke, 1995; Darmon et al., 1996; Darmon et al., 1995; Fernandez-Alnemri et al., 1996; Greenberg, 1996).

The finding that CrmA and TPCK prevent the oligonucleosome-sized DNA fragmentation in human cancer cell lines following CPT treatment without interfering with caspase activation and the occurrence of high molecular weight DNA fragmentation, indicate that CrmA- and TPCK-sensitive pathways are involved in CPT-induced oligonucleosome-sized DNA fragmentation. Our data also suggest that proteolytic caspase pathways may be associated with pathways triggering the high molecular weight fragmentation while other pathways may be associated with the occurrence of oligonucleosome-sized DNA fragmentation specifically after CPT treatment. Although, it is well known that CrmA is a potent inhibitor of caspase 1 and 8, it has been showed recently that CrmA is unlikely to inhibit caspase 3 and 6 *in vivo* (Zhou et al., 1997), the main caspases involved with DNA topoisomerase inhibitor-induced apoptosis (Dubrez et al., 1996; Martins et al., 1997; Sané et al., 1997; Schmitt et al., 1997; Schmitt et al., 1997). Although the important role of serine proteases in apoptosis has been supported by several observations, only few studies have identified putative enzymes. A 24 kDa serine protease has been identified and purified from apoptotic U937 cells (Wright et al., 1994) and others have partially purified from Jurkat T cells a serine protease activity in FAS-induced apoptosis (Schlegel et al., 1995). More recently, Liu et al. (1997)



had identified from HeLa cells a caspase activated DNA fragmentation factor (DFF) that induces DNA fragmentation when coincubated with nuclei. This novel heterodimeric protein functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation and shows no DNase activity on naked DNA. Therefore, it is likely that DFF plays a role in a more complex pathway that triggers DNA fragmentation between caspase-3 activation and putative endonucleases. However, the mechanisms by which DFF acts to trigger nuclear degradation and whether CrmA and TPCK interfere with DFF activity are still unknown.

In summary, our results with those of others, suggest that CrmA and TPCK may partially inhibit uncharacterized yet sensitive activities that are involved in pathways triggering the oligonucleosome-sized DNA fragmentation following CPT treatment.

**Acknowledgments** We would like to thank Drs V.M. Dixit and M. Tewari, Dept. of Pathology, University of Michigan Medical School (Ann Arbor, MI) for providing the pCDNA3-CrmA expression vector and Dr. J. Yuan, Cardiovascular Research Center, Massachusetts General Hospital-East (Charlestown, MA) for providing the anti-CrmA polyclonal antibodies. R.B. is supported by the Medical Research Council of Canada and by the National Cancer Institute of Canada with funds from the Canadian Cancer Society. R.B. is a recipient of a scholarship from the Medical Research Council of Canada in association with the Research Cancer Society Inc.

**REFERENCES**

Adjei, P. N., Kaufmann, S. H., Leung, W. Y., Mao, F., and Gores, G. J. (1996). Selective induction Of apoptosis in Hep 3b cells by topoisomerase I inhibitors : evidence for a protease-pepdependent pathway that does not activate cysteine rotease P32. *J. Clin. Invest.* 98, 2588-2596.

Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.

Ameisen, J. C., Estaquier, J., Idziorek, T., and De Bels, F. (1995). Programmed cell death and AIDS pathogenesis: significance and potential mechanisms. [Review]. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 200, 195-211.

Barry, M. A., Behnke, C. A., and Eastman, A. (1990). Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.* 40, 2353-2362.

Beere, H. M., Chresta, C. M., Alejo-Herberg, A., Skladanowski, A., Dive, C., Larsen, A. K., and Hickman, J. A. (1995). Investigation of the mechanism of

higher order chromatin fragmentation observed in drug-induced apoptosis. *Mol. Pharmacol.* 47, 986-96.

Beere, H. M., Chresta, C. M., and Hickman, J. A. (1996). Selective inhibition of topoisomerase ii By Icrf-193 does not support a role for topoisomerase ii activity in the fragmentation of chromatin during apoptosis of human leukemia cells. *Mol. Pharmacol.* 49, 842-851.

Berke, G. (1995). The CTL's kiss of death. *Cell* 81, 9-12.

Bertrand, R., Kohn, K., Solary, E., and Pommier, Y. (1995). Detection of apoptosis-associated DNA fragmentation using a rapid and quantitative filter elution assay. *Drug Development Res* 34, 138-144.

Bertrand, R., and Pommier, Y. (1995). Assessment of DNA damage in Mammalian cells by DNA filter elution methodology. In *Cell growth and apoptosis; A practical approach*, G. P. Studzinski, ed. (New-York: IRL Press), pp. 97-118.

Bertrand, R., Sarang, M., Jenkin, J., Kerrigan, D., and Pommier, Y. (1991). Differential induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II

inhibitors in human tumor cell lines with amplified c-myc expression. *Cancer Res.* *51*, 6280-6285.

Bertrand, R., Solary, E., Jenkins, J., and Pommier, Y. (1993). Apoptosis and its modulation in human promyelocytic HL-60 cells treated with DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Exp. Cell Res.* *207*, 388-97.

Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K. W., and Pommier, Y. (1994). Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp. Cell Res.* *211*, 314-21.

Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. (1996). Involvement of Mach, a novel Mort1/Fadd-interacting protease, in Fas/Apo-1- and Tnf receptor-induced cell death. *Cell* *85*, 803-815.

Bruno, S., DelBino, G., Lassota, P., Giaretti, W., and Darynkiewicz, Z. (1992). Inhibitors of proteases prevent endonucleolysis accompanying apoptotic death of HL60 leukemic cells and normal thymocytes. *Leukemia* *6*, 1113-1120.

Carson, D. A., and Ribeiro, J. M. (1993). Apoptosis and disease. *Lancet* *341*, 1251-4.

Darmon, A. J., Ley, T. J., Nicholson, D. W., and Bleackley, R. C. (1996). Cleavage of cpp32 by granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. *J. Biol. Chem.* *271*, 21709-21712.

Darmon, A. J., Nicholson, D. W., and Bleackley, R. C. (1995). Activation of the apoptotic protease Cpp32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* *377*, 446-448.

Del Bino, G., and Darzynkiewicz, Z. (1991). Camptothecin, Teniposide, or 4'-(9-acridinylamino)-3-methanesulfon-m-anisidide, but not mitoxantrone or doxorubicin, induces degradation of nuclear DNA in the S-phase HL-60 cells. *Cancer Res.* *51*, 1165-1169.

Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* *373*, 438-41.

Dubrez, L., Savoy, I., Hamman, A., and Solary, E. (1996). Pivotal role of a Devd-sensitive step in etoposide-induced and Fas-mediated apoptotic pathways. *EMBO J.* *15*, 5504-5512.

Ellis, R. E., Yuan, J., and Horvitz, H. R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 663-.

Enari, M., Talanian, R. V., Wong, W. W., and Nagata, S. (1996). Sequential activation of Ice-like and Cpp32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature(London)*, 380, 723-726.

Fernandes-Alnemri, T., Litwack G, and ES, A. (1994). CPP32 a novel apoptotic protein with homology to *C.elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian IL-1 converting enzyme. *J Biol. Chem* 269, 30761-30764.

Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E. S. (1995). Mch2, a new member of the apoptotic Ced-3/Ice cysteine protease gene family. *Cancer Res.* 55, 2737-42.

Fernandez-Alnemri, T., Amstrong, R. C., Krebs, J., Srinivasula, S. M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L. C., Trapani, J. A., Tomaselli, K. J., Litwack, G., and Alnemri, E. S. (1996). In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FDD-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 7464-7469.

Ghibelli, L., Maresca, V., Coppola, S., and Gualandi, G. (1995). Protease inhibitors block apoptosis at intermediate stages : a compared analysis of DNA fragmentation and apoptotic nuclear morphology. *FEBS Letters* 377, 9-14.

Golstein, P., Marquet, D., and Depraeterre, V. (1995). Fas bridging cell death and cytotoxicity: the reaper connection. *Immunol. Reviews* 146, 45-55.

Greenberg, A. H. (1996). Activation of apoptosis pathways by Granzyme B. *Cell Death Differ.* 3, 269-274.

Hara, S. S., Halicka, H. D., Bruno, S., Gong, J. P., Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z. (1996). Effect of protease inhibitors on early events of apoptosis. *Exp. Cell Res.* 223, 372-384.

Jaxel, C., Taudou, G., Portemer, C., Mirambeau, G., Panijel, J., and Duguet, M. (1988). Topoisomerase inhibitors induce irreversible fragmentation of replicated DNA in concanavalin A stimulated splenocytes. *Biochemistry* 27, 95-99.

Kaufmann, S. H. (1989). Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res.* 49, 5870-5878.

Korsmeyer, S. J. (1995). Regulators of cell death. *Trends Genet.* *11*, 101-5.

Kumar, S., and Harvey, N. L. (1995). Role of multiple cellular proteases in the execution of programmed cell death. *FEBS Lett.* *375*, 169-173.

Lazebnik, Y. A., Takahashi, A., Moir, R. D., Goldman, R. D., Poirier, G. G., Kaufmann, S. H., and Earnshaw, W. C. (1995). Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 9042-9046.

Liu, L. F. (1989). DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu. Rev. Biochem.* *58*, 351-375.

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1997). DFF, a heterodimer protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* *89*, 175-184.

Martins, L. M., Kottke, T., Mesner, P. W., Basi, G. S., Sinha, S., Frigon, N., Tatar, E., Tung, J. S., Bryant, K., Takahashi, A., Svingen, P. A., Madden, B. J., McCormick, D. J., Earnshaw, W. C., and Kaufmann, S. H. (1997). Activation of multiple interleukin-1- $\beta$  converting enzyme homologues in cytosol and



nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 7421-7430.

Miller, S. A., Dykes, D. D., and Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215-.

Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M. (1996). Flice, a novel Fadd-homologous Ice/Ced-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.

Nagata S, and Golstein P (1995). The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1455.

Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A., and et al. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature (London)* 376, 37-43.

Pantaleo, G., and Fauci, A. (1995). Apoptosis in HIV infection. *Nat. Med.* *1*, 118-120.

Patel, T., Gores, G. J., and Kaufmann, S. H. (1996). The role of proteases during apoptosis. *FASEB J.* *10*, 587-597.

Pommier, Y., and Kohn, K. W. (1989). Topoisomerase II inhibition by antitumor intercalators and demethylepipodophyllotoxins. In *Developments in Cancer Chemotherapy*, R. I. Gazer, ed. (Boca Raton, FA: CRC Press, Inc.), pp. 175-196.

Pommier, Y., Leteurtre, F., Fesen, M. R., Fujimori, A., Bertrand, R., Solary, E., Kohlhagen, G., and Kohn, K. W. (1994). Cellular determinants of sensitivity and resistance to DNA topoisomerase inhibitors. *Cancer Invest.* *12*, 530-42.

Pommier, Y., and Tanizawa, A. (1993). Mammalian DNA topoisomerase I and its inhibitors. In *Cancer Chemotherapy*, J. Hickman and T. Tritton, eds. (Oxford: Blackwell Scientific Publications LTD), pp. 214-250.

Quan, L., Caputo, A., Bleackley, R., Pickup, D., and Salvesen, C. (1995). Granzyme B is inhibited by the cowpox virus serpin cytokine response modifier. *J. Biol. Chem.* *270*, 10377-10379.

Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y., and Jacobson, M. D. (1994). Programmed cell death and the control of cell survival. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences* 345, 265-8.

Ray, C. A., Black, R. A., Kronheim, S. R., Greenstreet, T. A., Sleath, P. R., Salvensen, G., and Pickup, D. J. (1992). *Cell* 69, 597-604.

Reed, J. C. (1994). Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol.* 124, 1-6.

Rusnak, J. M., Calmels, T. P. G., Hoyt, D. G., Kondo, Y., Yalowich, J. C., and Lazo, J. S. (1996). Genesis of discrete higher order DNA fragments in apoptotic human prostatic carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* 49, 244-252.

Schlegel, J., Peters, I., and Orrenius, S. (1995). Isolation and partial characterization of a protease involved in Fas-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 364, 139-142.

Schmitt, E., Cimoli, G., Steyaert, A., and Bertrand, R. (1998). Bcl-xL modulates apoptosis induced by anticancer drugs and delays DEVDase and DNA fragmentation-promoting activities. *Exp. Cell Res.* 240, 107-121.

Schmitt, E., Steyaert, A., Cimoli, G., and Bertrand, R. (1998). Bax promotes apoptosis induced by cancer chemotherapy and accelerates the activation of caspase 3-like cysteine proteases in p53 double mutant B lymphoma Namalwa cells. *Cell Death and Diff.* 5, 506-516.

Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1996). Bcl-2 expression prevents activation of the Ice protease cascade. *Oncogene* 12, 2251-2257.

Shimizu, T., and Pommier, Y. (1996). DNA fragmentation induced by protease activation in p53-null human leukemia HL60 cells undergoing apoptosis following treatment with the topoisomerase I inhibitor camptothecin - cell-free system studies. *Exp. Cell Res.* 226, 292-301.

Solary, E., Bertrand, R., Kohn, K. W., and Pommier, Y. (1993). Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Blood* 81, 1359-68.

Solary, E., Dubrez, L., Eymin, B., Bertrand, R., and Pommier, Y. (1996). Apoptosis induction in human leukemic cells by topoisomerase I and II inhibitors. *Bull. Cancer* 83, 205-212.

Suda, T., and Nagata, S. (1994). Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.* 179, 873-9.

Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995). Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J. Biol. Chem.* 270, 3255-60.

Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., Poirier, G. G., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1995). Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-9.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-62.

Walker, P. R., Smith, C., Youdale, T., Leblanc, J., Whitfield, J. F., and Sikorska, M. (1991). Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res.* 51, 1078-1085.

Weaver, V. M., Lach, B., Walker, P. R., and Sikorska, M. (1993). Role of proteolysis in apoptosis: involvement of serine proteases in internucleosomal DNA fragmentation in immature thymocytes. *Biochem. Cell Biol.* *71*, 488-500.

Wright, S. C., Wei, Q. S., Zhong, J., Zheng, H., Kinder, D. H., and Larrick, J. W. (1994). Purification of a 24-kD protease from apoptotic tumor cells that activates DNA fragmentation. *J. Exp. Med.* *180*, 2113-23.

Wyllie, A. H. (1992). Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metast. Rev.* *11*, 95-103.

Wyllie, A. H. (1987). Apoptosis: cell death under homeostatic control. *Arch. Toxicol. Suppl.* *11*, 3-10.

Yoshida, A., Takauji, R., Inuzuka, M., Ueda, T., and Nakamura, T. (1996). Role of serine and Ice-like proteases in induction of apoptosis by etoposide in human leukemia HL-60 cells. *Leukemia* *10*, 821-824.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., Horvitz, R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukine-1B-converting enzyme. *Cell* *75*, 641-652.

Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V. M., and Salvesen, G. S. (1997). Target protease specificity of the viral serpin Crma : analysis of five caspases. *J. Biol. Chem.* 272, 7797-7800.

## FIGURE LEGENDS

### **Fig 1. Kinetics of DNA fragmentation induced by CPT in control and CrmA expressing Namalwa and U-937 cells.**

[<sup>14</sup>C]Thymidine-labeled cells were treated for 30 min with 1.0  $\mu$ M CPT. After drug removal, cells were incubated in drug free-medium and at the indicated times, DNA fragmentation was determined by DNA filter elution assays. Results are expressed as the percent DNA fragmentation of treated cells relative to untreated cells. Values are given as the means  $\pm$  SE of four independent experiments performed in duplicate.  $\circ$ , Nam/CrmA- cells;  $\bullet$ , Nam/CrmA+ cells and;  $\square$ , U-937 cells.

### **Fig 2. Oligonucleosome-sized and high molecular weight DNA fragmentation induced by CPT in Namalwa cells.**

At indicated times (number above each lane) after CPT treatment (1  $\mu$ M; 30 min), total DNA was extracted from Namalwa (upper panels) and Namalwa/CrmA<sup>+</sup> cells (lower panels) and DNA fragments separated by agarose gel electrophoresis (left panels) and high molecular DNA fragments were analysed by TAPFE in a Beckman GeneLine<sup>TM</sup> apparatus (right panels). Following electrophoresis, DNA was visualized by ethidium bromide staining.



Molecular weight markers (M) are 1 kbp DNA markers (Gibco-BRL) and 50 kbp concatemers lambda DNA (Sigma). C, control untreated cells.

**Fig 3. Effect of TPCK on oligonucleosome-sized and high molecular weight DNA fragmentation induced by CPT in Namalwa and U-937 cells.**

At indicated times after CPT treatment (1  $\mu$ M; 30 min) in the presence or absence of various concentrations of TPCK (as indicated), total DNA was extracted from Namalwa and U-937 cells and DNA fragments visualized by ethidium bromide staining following standard agarose gel electrophoresis (upper panels) and TAPFE in a Beckman GeneLine™ apparatus (lower panels). Molecular weight markers (M.W.M or M) are the 1 kb markers obtained from Gibco-BRL and 50 kbp concatemers lambda DNA from Sigma. C, control untreated cells.

**Fig 4. Detection of TPCK-sensitive activities in a cell-free system.**

Cytosolic extracts were prepared from U-937 (open bars), Namalwa (solid bars) and CrmA expressing Namalwa cells (hatched bars) at the indicated times following CPT treatment (1.0  $\mu$ M for 30 min). [<sup>14</sup>C]Thymidine-labeled isolated nuclei from untreated cells were then incubated for 30 min with cytosolic extracts alone or in the presence of TPCK (0.1 mM). DNA fragmentation was determined by filter elution assays. Results are expressed as percent DNA

fragmentation relative to untreated cells. Error bars represent the SE of four independent experiments performed in duplicate.

**Fig 5. Caspase-3 like activities in CPT-treated cells.**

At the indicated times following 30 min treatment with CPT (1.0  $\mu$ M), cytosolic extracts were prepared from Namalwa (A) and U-937 cells (B) in the absence (○) or presence of 10  $\mu$ M TPCK (●) and from CrmA expressing Namalwa cells (□). Caspase activities were monitored continuously at 37° by detecting fluorescence emission in the presence of Ac-DEVD-AMC at an excitation wavelength of 380 nm and emission wavelength of 460 nm. Enzyme activities were measured as initial velocities and expressed as relative intensity per minute for each milligram. Points represent the means of two independent determinations for Namalwa cells and of a single experiment for U-937 cells. In C, various concentrations of TPCK were added directly to active extracts obtained 4 h after CPT treatment (Namalwa cells) and caspase 3 activities were measured as initial velocities. Results are expressed relative to control activity.

Figure 1 : Sané et al.

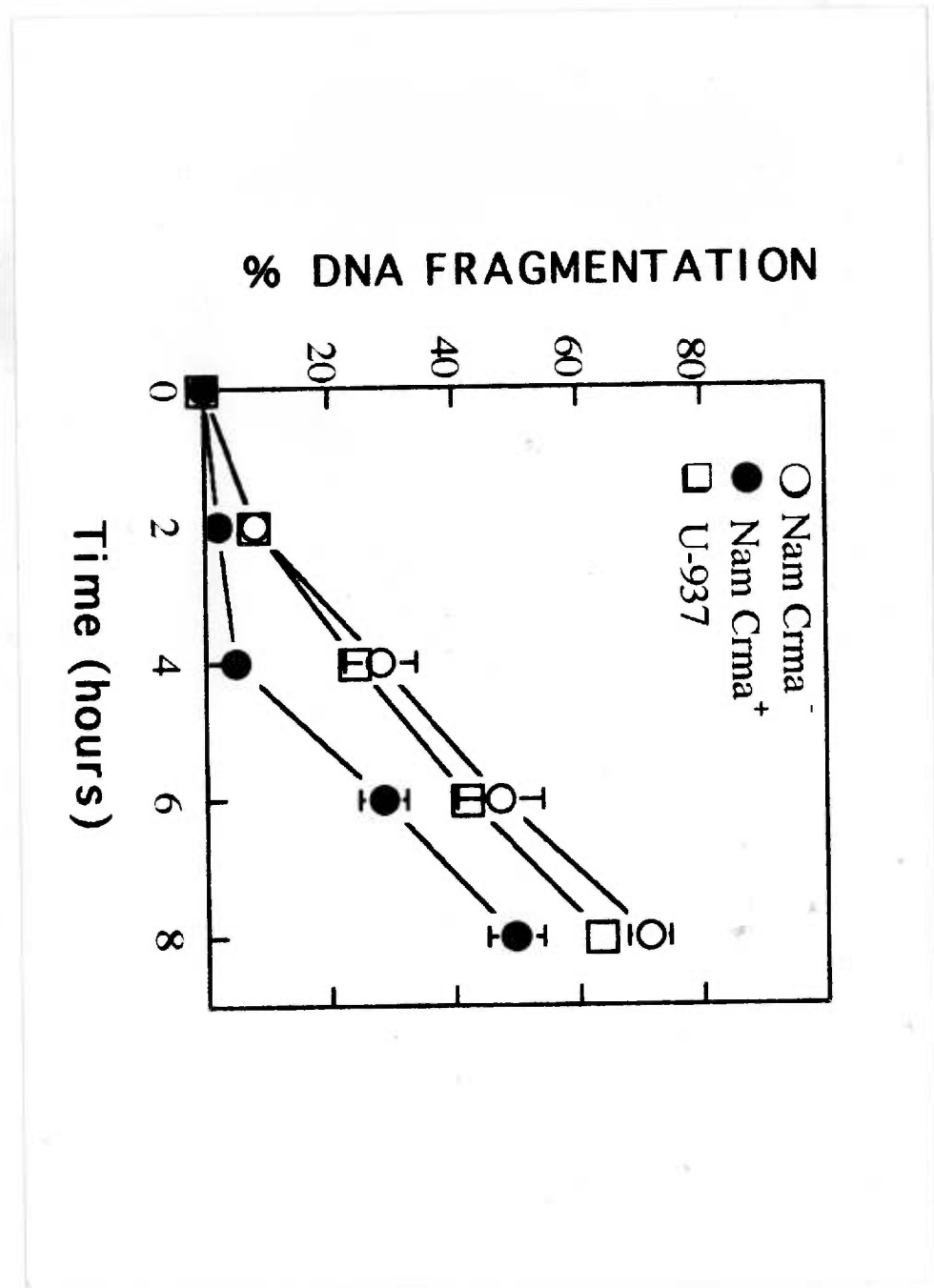


Figure 2 : Sané et al.

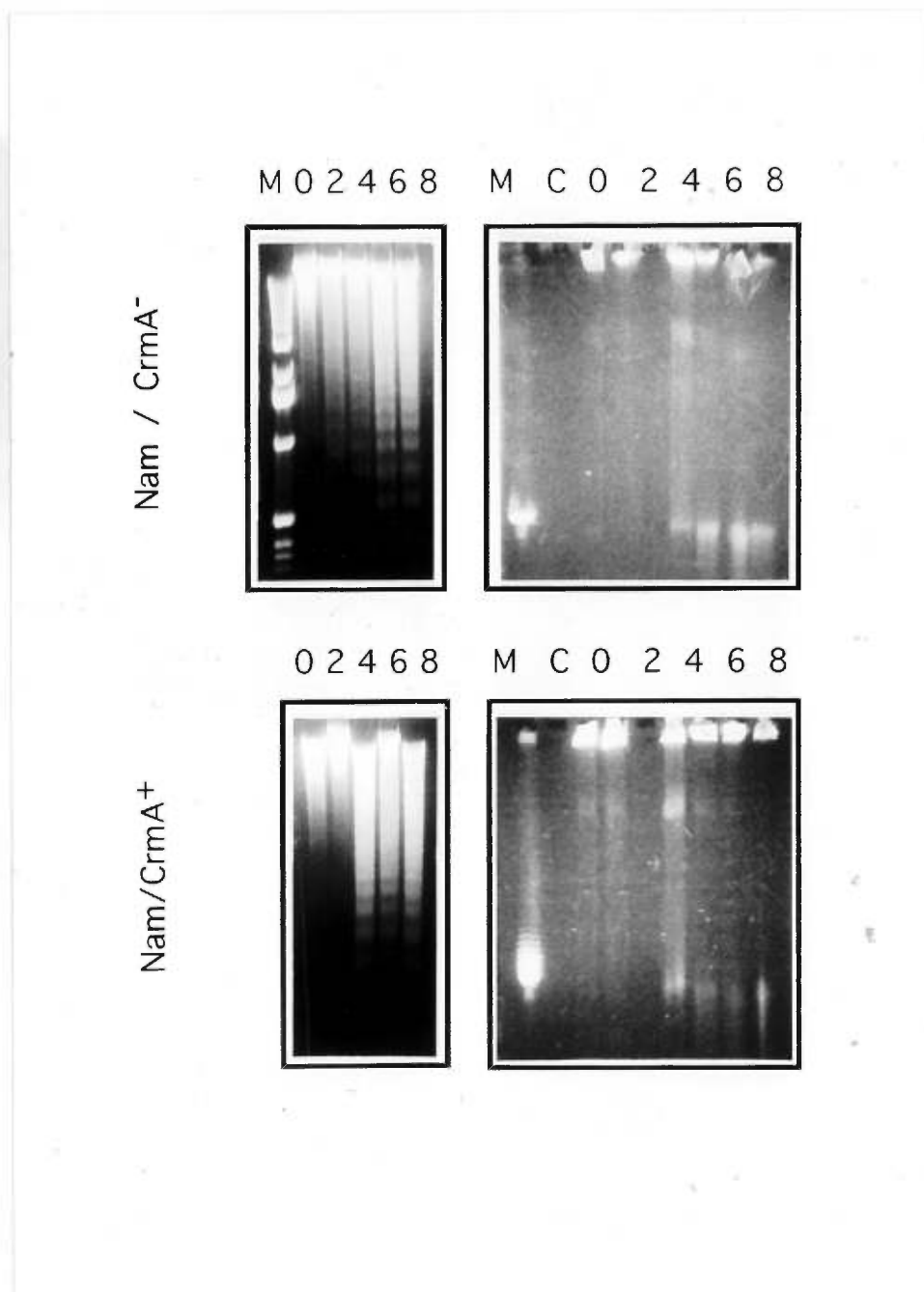


Figure 3 : Sané et al

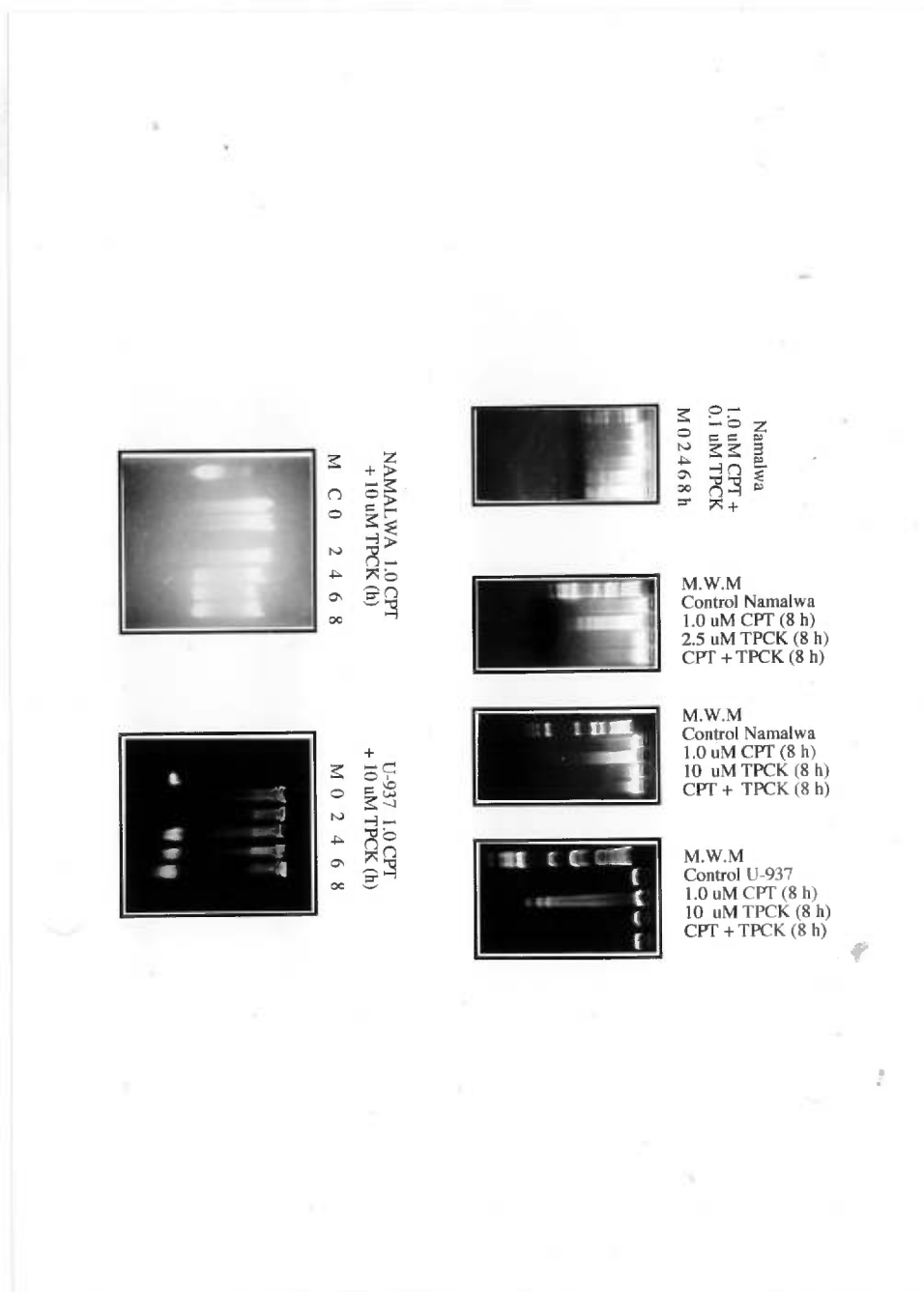


Figure 4 : Sané et al.

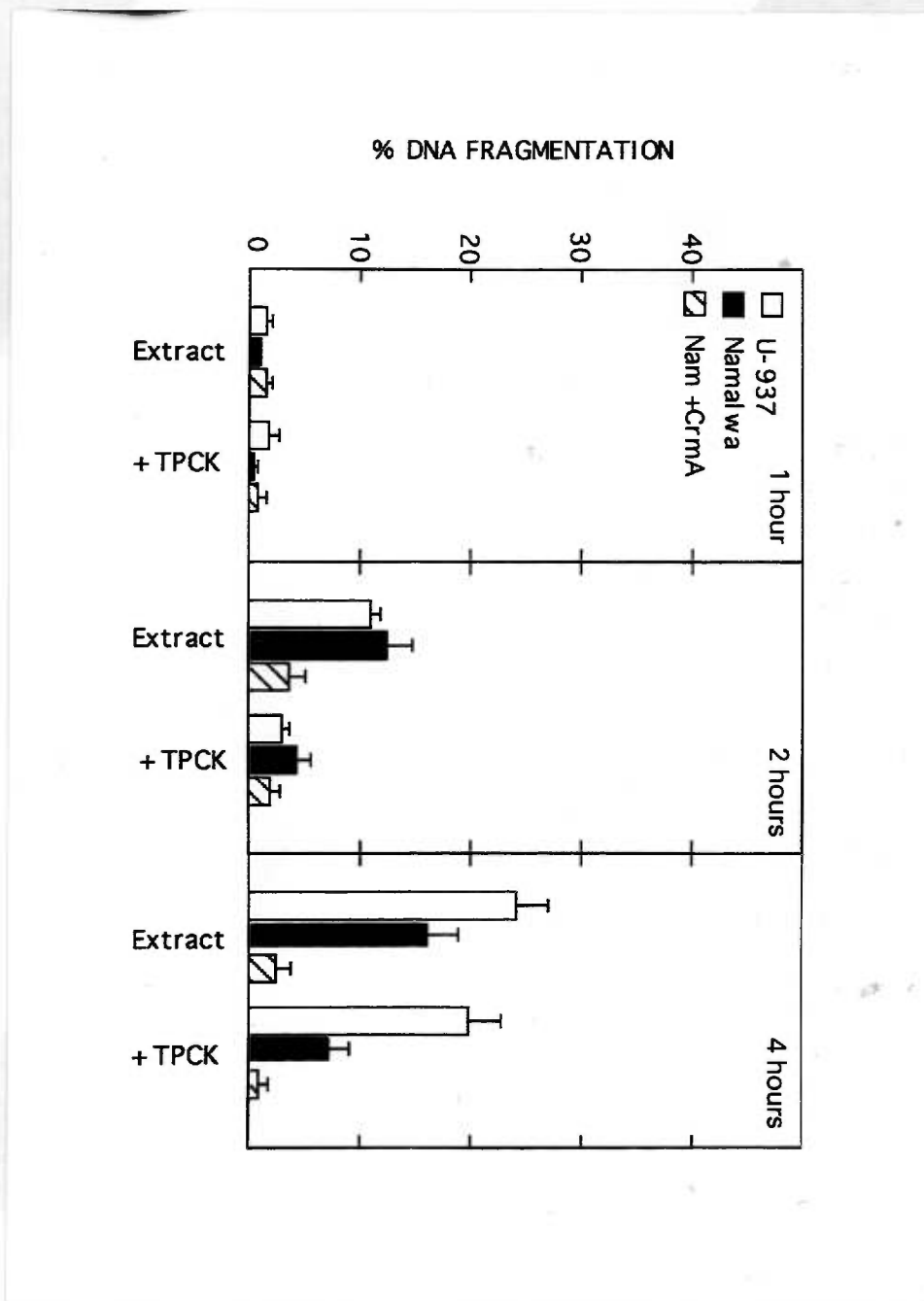
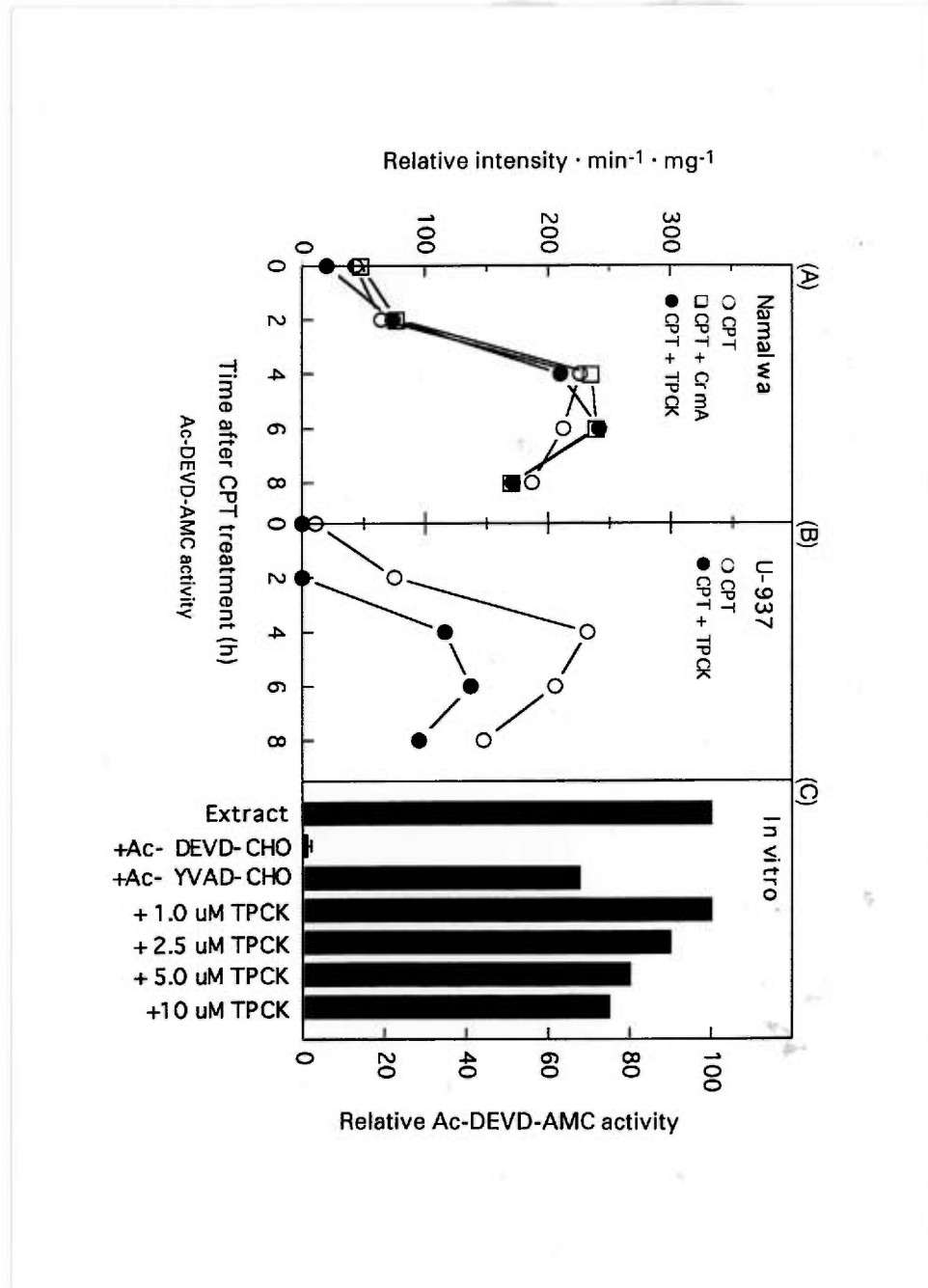


Figure 5 : Sané et al.



**2.2 Distinct steps in DNA fragmentation pathway during camptothecin-induced apoptosis involved caspase, benzyloxycarbonyl- and N-tosyl-L-phenylalanylchloromethyl ketone- sensitive activities (Cancer Research 58 : 3066-3072, 1998)**

Sané, A.T. and Bertrand, R.\*

Hospital Research Center of University of Montreal (CHUM) , Notre-Dame Hospital, Montreal (Quebec), H2L 4M1 Canada

*Running title: CPT-induced DNA fragmentation pathway during apoptosis*

(\*) To whom correspondence should be addressed: Hospital Research Center of University of Montreal (CHUM), Notre-Dame Hospital, Room Y-5634, 1560 Sherbrooke St. East, Montreal (Quebec) H2L 4M1 Canada

Phone: (514) 281-6000 ext 6615

Fax: (514) 896-4689

Email: bertranr@ere.umontreal.ca



**ABSTRACT**

Monocytic-like leukemia U-937 cells rapidly undergo morphological changes and DNA fragmentation typical of apoptosis following treatment with DNA topoisomerase I inhibitor (camptothecin, CPT). The tripeptide derivative benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)fluoromethyl ketone (zVAD-fmk) blocks DEVDase activity and prevents the occurrence of high molecular weight and oligonucleosome-sized DNA fragments associated with apoptosis in CPT-treated cells. In contrast, N-tosyl-L-phenylalanylchloromethyl ketone (TPCK) does not prevent DEVDase activity and high molecular weight DNA fragmentation but abrogates completely the appearance of oligonucleosome-sized DNA fragmentation. These results suggest that caspase 3-like activities are involved with high molecular weight DNA fragmentation pathway while TPCK-sensitive activities are involved in oligonucleosome-sized DNA fragmentation pathway in CPT-treated cells. Electron micrographs reveal that caspase inhibition by zVAD-fmk abrogates also the typical morphological changes associated with apoptosis while TPCK does not delay these morphological changes typical of apoptosis. Caspase inhibition slows passage of the cells through G<sub>2</sub> and causes a transient accumulation of these cells at the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle following CPT treatment. In a cell-free system, when purified nuclei are incubated with apoptotic cytosolic extracts obtained from CPT-treated U-937 cells, TPCK causes a similar effect in abrogating the

oligonucleosome-sized DNA fragmentation while not affecting DEVDase activity. Addition of either benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-free carboxyl group (zVAD-COOH) or Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde (Ac-DEVD-CHO) completely inhibits DEVDase activity in these extracts. However, Ac-DEVD-CHO does not affect the occurrence of oligonucleosome-sized DNA fragmentation in the cell-free system while the benzyloxycarbonyl- derivatives zVAD-COOH, zVA-OH, zV-OH and z-hydrazide abolish it markedly. Taken together, these observations show the pivotal role of DEVDase activity in triggering the apoptotic process and high molecular weight DNA fragmentation while TPCK- and benzyloxycarbonyl- sensitive activities are involved in oligonucleosome-sized DNA fragmentation pathway induced by CPT.

*Abbreviations used in this paper:* CPT, 20-S-camptothecin lactone; TPCK, N-tosyl-L-phenylalanylchloromethyl ketone; TLCK, N-tosyl-L-lysylchloromethyl ketone; DCI, dichloro-isocoumarin; zVAD-fmk, benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethyl ketone; zVAD-COOH, benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-free carboxyl group; zVA-OH, benzyloxycarbonyl-Val-Ala-free hydroxyl group; zV-OH, benzyloxycarbonyl-Val-free hydroxyl group; z-NHNH<sub>2</sub>, benzyloxycarbonyl hydrazide; Ac-DEVD-CHO, Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde; Ac-DEVD-AMC, Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-methylcoumarin; DABCYL-YVADAPV-EDANS, 4-(4-dimethyl-aminophenylazo)benzoyl-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Val-5-[(2-aminoethyl amino)-naphthalene-1-sulfonic acid; TAFE, transverse alternating pulsed field electrophoresis.

## INTRODUCTION

Programmed cell death (apoptosis) is a genetically regulated mechanism that occurs during physiological processes such as embryonic development, maturation of the immune cells, tissue remodeling, maintenance of tissue homeostasis and occurs because of physical or chemical stress (1-3). Deregulation of apoptosis accounts for many pathological conditions including cancer, immune-suppression and neurodegeneration (4-8). Chemotherapeutic drugs such as DNA topoisomerase I and II inhibitors induce apoptosis in various cell lines (9-13). Cells undergoing apoptosis show distinctive morphological changes including cell shrinkage, convolution of the plasma membrane, ultimately producing apoptotic bodies, nuclear condensation and DNA fragmentation (14). Cleavage of chromatin into nucleosomal fragments was once considered the biochemical hallmark of apoptosis (15). There is now evidence of morphological apoptosis associated with high molecular weight DNA fragmentation without internucleosomal DNA fragmentation (16, 17). The ced-3/Ice-like cysteine protease family or caspase family plays a central role in programmed cell death (18). The pivotal role of caspase 3 activation (19-21) in mediating drug-induced apoptosis in several cell lines including U-937 cells, has been reported recently (22-26). Caspase 3 activation is a crucial step that triggers cytoplasmic changes, nuclear disintegration and DNA fragmentation pathway. Besides its proteolytic effect on various proteins and

enzymes involved in chromatin organization and DNA metabolism, caspase 3 activates also DNA fragmentation promoting factors such as DFF (27). Several studies have also revealed that N-tosyl-L-phenylalanylchloromethyl ketone (TPCK)-, N-tosyl-L-lysinychloromethyl ketone (TLCK)- and dichloroisocoumarin (DCI) -sensitive activities are involved in DNA fragmentation pathway during apoptosis induced by DNA topoisomerase inhibitors (23, 28-36). In this study, we investigated the effect of zVAD-fmk and TPCK upon the occurrence of morphological changes associated with apoptosis and the appearance of both high molecular weight and oligonucleosome-sized DNA fragmentation in CPT-treated monocytic U-937 cells and using a cell-free system. We showed that higher order and internucleosomal DNA cleavage in the apoptotic process are independent steps that involved caspase, benzyloxycarbonyl- and TPCK -sensitive activities.

## **MATERIALS ET METHODS**

**Chemicals.** 20-S-camptothecin lactone (CPT) and N-tosyl-L-phenylalanylchloromethyl ketone (TPCK) were purchased from Sigma Chemicals Co. (St-Louis, MO). The fluorogenic peptide derivatives Ac-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) and 4-(4-dimethylaminophenylazo)benzoyl-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Val-5-[(2-amino-ethyl)

amino]- naphthalene-1-sulfonic acid (DABCYL-YVADAPV-EDANS) and the peptide derivatives Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO (Ac-DEVD-CHO), benzyloxycarbonyl-Val-Ala-free hydroxyl group (zVA-OH), benzyloxycarbonyl-Val-free hydroxyl group (zV-OH) and benzyloxycarbonyl hydrazide (z-NHNH<sub>2</sub>) were purchased from Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA). The caspase inhibitor benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe) fluoromethyl ketone (zVAD-fmk) was purchased from Enzyme Systems Products (Livermore, CA). Pig liver carboxylic-ester hydrolase (esterase; EC 3.1.1.1) was obtained from Boehringer-Mannheim Canada (Laval, Que) and used in cell-free system to convert zVAD-fmk into zVAD-free carboxyl group (zVAD-COOH). All other chemicals were of reagent grade and purchased either from Sigma and ICN or from other local sources.

**Cell culture and drug treatments.** The human U-937 cell line obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Md), was grown in suspension culture at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U / ml penicillin and 100 µg / ml streptomycin (Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, NY). Exponentially growing cells were used throughout all experiments at a concentration of 5 x 10<sup>5</sup> cells / ml. Cells were treated with CPT at a concentration of 1.0 µM in the absence or presence of zVAD-fmk or TPCK. Following 30 min incubation at 37°C, cells

were pelleted by centrifugation, the supernatant discarded and replaced with fresh medium with or without zVAD-fmk or TPCK. Cell number and viability were estimated by trypan blue dye exclusion assay using a hemocytometer and by MTT-based colorimetric assay according to the manufacturer (Boehringer Mannheim).

**Analysis of DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis.** To visualize the oligonucleosome-sized DNA fragments, at specified times after drug treatment, cellular DNA was extracted by a salting-out procedure as described previously (37). Electrophoresis was done in 1.6% agarose gel in Tris-acetate buffer (pH 8.0). High molecular weight DNA fragments were analyzed by Transverse Alternating Pulsed Field Electrophoresis (TAFE) using a Beckman Geneline™ apparatus (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA). Briefly, agarose block containing cells were incubated for 24 h at 42°C under agitation in a solution containing 1.0 mg / ml proteinase K or 100 µg / ml pronase, 1% N-lauryl-sarcosine, 0.2% sodium deoxycholate and 100 mM EDTA (pH 8.0). The agarose-embedded DNA was soaked in TE buffer pH 8.0 (20 mM Tris-HCL, 50 mM EDTA) before electrophoresis on a 1.2% agarose gel. Gels were subjected to a 30 min run at 170 volts with a pulse time of 4 sec, followed by a 24 h run at 150 volts with a pulse time of 60 sec. Electrophoresis was done at 18°C in TAFE buffer ( 10 mM Tris, 5 mM EDTA-free acid, 0.025% (v/v)

glacial acetic acid). Following electrophoresis DNA was visualized by ethidium bromide staining.

**Determination of caspase activities.** Cytosolic extracts from untreated and treated cells were prepared as described above. Caspase activities were measured by monitoring fluorescence continuously in a dual luminescence fluorometer (LS 50B Perkin Elmer) using excitation wavelength of 360 nm and emission wavelength of 490 nm for the substrate DABCYL-YVADAPV-EDANS and excitation wavelength of 380 nm and emission wavelength of 460 nm for Ac-DEVD-AMC. Reactions were carried out in cuvettes and the temperature was maintained at 37°C using a water-jacketed sample compartment. The assay mixture contained 100 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol, 5 mM DTT, 5 mM EDTA and 200 µM fluorogenic peptide, Ac-DEVD-AMC or DABCYL-YVADAPV-EDANS. Enzyme activities were detected as initial velocities and expressed as relative intensity / min / mg. For inhibition studies, percent relative enzyme activities are expressed from initial velocities using the formula:

$$(V_i / V_o) \times 100$$

Where  $V_i$  is the initial velocities in presence of inhibitor and  $V_o$  is initial velocities without inhibitors.



**Electron microscopy.** Cells were centrifuged at 400g for 10 min and washed in ice-cold PBS. Cell fixation was done in 0.1 M Millonig's phosphate buffer (pH 7.4, 292 mOsm) containing 2.5% glutaraldehyde, staining with 2% uranyl acetate, and dehydration with several ethanol treatments. Sections (500 to 700 Å) were mounted on copper grids and stained in lead citrate. Samples were examined (JFE Enterprises, Brookeville, MD) by transmission electron microscopy using a Zeiss Em10 CA microscope.

**Analysis of DNA content by flow cytometry.** Cells were centrifuged at 1 000 x g for 2 min and washed in ice-cold PBS. Cell pellets were fixed in 70% ethanol for 2 h at 4°C. After incubation, cells were pelleted by centrifugation and resuspended in a solution of 70% ethanol containing 150 µg / ml RNase A (Sigma) and incubated for 30 min at room temperature. Cells were then pelleted by centrifugation and resuspended in PBS. Propidium iodide (50 µg / ml) was added before cytofluorometry analysis. DNA content and cell cycle distribution were analyzed using a Becton-Dickinson FACSTAR Plus flow cytometer.

**Reconstituted cell-free system.** To obtain the cytosolic extracts, control and CPT-treated U-937 cells (1 µM; 4 h after CPT treatment) were pelleted by centrifugation, washed twice in ice-cold PBS and resuspended in lysis buffer containing 10 mM Hepes (pH 7.4), 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5

mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.15U / ml aprotinin, 10% glycerol and 0.3% NP-40 at a density of  $10^7$  cells /ml as described previously (38, 39). After incubation at 4°C for 10 min with gentle agitation, samples were centrifuged at 10 000 x g for 10 min and supernatants used as cytosolic extracts. Nuclei were prepared from control U-937 cells according to a previously described protocol, with minor modifications (40). Briefly, cells were resuspended at a density of  $1.0 \times 10^8$  cells / ml in a lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2.5 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.5 M sucrose and 0.05% NP-40 and incubated on ice for 10 min. After centrifugation at 800 x g for 10 min at 4°C, the pelleted nuclei were washed twice in lysis buffer without NP-40, resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2.1 M sucrose and then layered over a cushion of the same buffer. After centrifugation at 30,000 rpm in a Beckman SW-55 rotor for 30 min at 4°C, the pelleted purified nuclei were resuspended in the cytosol extraction buffer without NP-40. Isolated nuclei were then incubated with cytosolic extracts for 30 min at 37°C in the absence or presence of inhibitors. Esterase (20 µg / ml) was added to convert zVAD-fmk into its active form zVAD-COOH in the reconstituted cell-free system. Reactions were stopped by adding 0.2% SDS and 1.0 mg / ml proteinase K and incubated for 30 min at 50°C. DNA was then extracted by the salting-out procedure and DNA fragments visualized by ethidium bromide staining following conventional agarose gel electrophoresis and TAFE.

## RESULTS

### **Effect of zVAD-fmk and TPCK on CPT-induced high molecular weight and oligonucleosome-sized DNA fragmentation.**

DNA fragmentation in apoptotic cells has at least two distinct components. DNA cleavage starts at the sites of attachment of the domains to the nuclear matrix to generate high molecular weight fragments of approximately 200-300 and 45-50 kbp (41). Subsequently, DNA is cleaved within internucleosomal linkers, producing mono- and oligonucleosome-sized DNA fragments constitutive of the characteristic DNA laddering that can be visualized by standard agarose gel electrophoresis (15). We monitored and visualized the oligonucleosomal and higher molecular weight DNA fragmentation by standard agarose gel electrophoresis and TAFE, respectively. U-937 cells were treated with 1.0  $\mu$ M CPT for 30 min and at selected times following drug treatment, total DNA was extracted or agarose-embedded DNA prepared. In Fig.1 (top left), the oligonucleosome-sized DNA fragmentation was visualized as early as 4 h after drug treatment with intensification 8 h following drug treatment. Kinetic of high molecular weight DNA fragments (Fig. 1, top right) showed predominance of 45-50 kbp fragments. The higher molecular weight DNA fragments of > 600 kbp seen in each lane are probably not involved as initial phase of DNA fragmentation taking place in programmed cell death but result from DNA-protein complex formation stabilized by DNA topoisomerase

inhibitors that would ultimately signal initiation of apoptosis (42, 43). These results confirm the CPT induction of oligonucleosome-sized DNA fragmentation and high molecular weight DNA fragmentation in U-937 cells. Previous reports showed that oligonucleosome-sized DNA fragmentation could be inhibited by series of protease inhibitors (23, 28-35). To analyze the effect of TPCK in these cells, U-937 cells were treated with CPT for 30 min (1.0  $\mu$ M) in the presence of two different concentrations of TPCK and total DNA was extracted or agarose-embedded DNA prepared. At a concentration of 1.0  $\mu$ M, TPCK lowered slightly the intensity of oligonucleosome-sized DNA fragmentation without delaying its occurrence (data not shown). At 10  $\mu$ M, TPCK completely abrogated the oligonucleosome-sized DNA fragmentation (Fig. 1, bottom left). However, even at the highest concentration used (10  $\mu$ M), TPCK did not abrogate the occurrence of high molecular weight DNA fragmentation (bottom right). Interestingly, treatment of U-937 cells with 10  $\mu$ M TPCK alone can induce the occurrence of high molecular weight DNA fragmentation (data not shown). This observation is consistent with those of others that revealed that distinct TPCK activities may be important for cell survival while others are involved for internucleosomal cleavage of DNA (35). Our results support the involvement of TPCK-sensitive activities in oligonucleosome-sized DNA fragmentation pathway induced by CPT. In contrast, zVAD-fmk, an inhibitor of various caspases, abrogates completely the occurrence of high molecular weight DNA fragmentation. At 100  $\mu$ M, zVAD-

fmk delayed the appearance of both the characteristic DNA ladder (Fig. 2, top left) and the 45-50 kbp DNA fragments (Fig. 2, top right). However, 300  $\mu$ M zVAD-fmk completely abrogated the oligonucleosome-sized and the high molecular weight DNA fragmentation (Fig. 2, bottom). High concentration of zVAD-fmk is usually required to favor its cellular uptake and its conversion into active free carboxyl form (zVAD-COOH) by cellular esterase activities (44). Taken together, these data suggest that caspase activities are involved more specifically in high molecular weight DNA fragmentation pathway. Moreover, high molecular weight DNA fragmentation appears to be an obligatory step to oligonucleosome-sized DNA fragmentation in these cells that is dependent upon TPCK-sensitive activities.

#### **Effect of zVAD-fmk and TPCK on caspase activities.**

Many caspases are involved in the apoptotic process and their activities are undoubtedly associated with the process of cell death itself (45-47). Recent studies have reported that caspase 3 is the major death associated protease involved following DNA-damaging agents like DNA topoisomerase inhibitors and caspase 3 activation coincides with apoptosis induction in U-937 cells (22-26, 36). We monitored the effect of z-VAD-fmk and TPCK on caspase activities in CPT-treated cells using the specific fluorogenic peptide substrates DABCYL-YVADAPV-EDANS and Ac-DEVD-AMC (Fig. 3). DEVDase activity measured by DEVD-AMC hydrolysis in CPT-treated U-937 cells,

increased significantly after drug treatment with peak activity around 4 h after drug treatment. We observed a slight difference in DEVD-AMC hydrolysis activity in cytosolic extracts obtained from CPT + TPCK-treated cells showing that 10  $\mu$ M TPCK has a weak effect on DEVDase activity. However, 10  $\mu$ M TPCK does not prevent high level of DEVDase activity following CPT-treatment. This observation is consistent with those of others who reported that low concentration TPCK does not prevent cleavage of specific caspase substrates (35). In contrast, in cytosolic extracts obtained from CPT + zVAD-fmk-treated cells, no DEVDase activity is detected (Fig 3). No increase in caspase 1-like activity was detected also using the peptide substrate DABCYL-YVADAPV-EDANS in all extracts, suggesting that caspase 1 and 8 are unlikely involved in CPT-induced apoptosis (not shown).

#### **Effect of zVAD-fmk and TPCK on cell viability, morphology and growth.**

To evaluate the effect of zVAD-fmk and TPCK on cell survival after CPT treatment, kinetics of cell growth and survival were measured by trypan blue dye exclusion and MTT-based colorometric assays. As shown in Fig. 4, control U-937 cells grow exponentially throughout the 24 h incubation time while CPT-treated cells die rapidly. Addition of TPCK does not prevent CPT-treated cells from dying. Interestingly, addition of z-VAD-fmk maintains substantial membrane permeability and MTT-based metabolic activity in CPT-treated cells. These results suggest that z-VAD-fmk, which prevents caspase activation

and high molecular weight DNA fragmentation, momentarily protects cells from CPT-induced death. In contrast, TPCK that prevents the oligonucleosome-sized DNA fragmentation without interfering with DEVDase activity and high molecular weight DNA fragmentation does not protect cell from dying. To investigate further the effect of z-VAD-fmk and TPCK on CPT-induced apoptosis, electron micrographs were analyzed to evaluate their effects on cellular morphology. Fig. 5 shows that the nuclei of healthy U-937 are irregular in shape, with gulfs and protrusions. CPT-treated cells show segregation of chromatin into hyper-condensed domains along the nuclear envelope and cytoplasm blebbing. Cotreatment of the cells with TPCK failed to prevent the morphological changes typical of apoptosis to occur. In contrast, zVAD-fmk treatment inhibited completely the characteristic morphological events associated with apoptosis, including chromatin condensation and cell shrinkage in CPT-treated cells. In view of the results obtained in DNA fragmentation analysis, these micrographs suggest that the observed morphological changes associated with apoptosis are an event that is independent of the oligonucleosome-sized DNA fragmentation in the apoptotic process but coincides with the appearance of DEVDase activity and high molecular weight DNA fragmentation.

To investigate further the effect of zVAD-fmk on cell proliferation in CPT-treated cells, DNA content and cell cycle distribution was measured by flow cytometry. The CPT-treated cells show massive sub-diploid DNA content with

an increase from 2% (at 0 h) to 80% (at 16 h) of apoptotic cells (Fig. 6, left). TPCK seems to reduce substantially the level of the sub-diploid DNA peaks (60% at 16 h) which reflects its inhibitory effect on oligonucleosome-sized DNA fragmentation (Fig. 6, middle). The observation indicate also that cells containing high molecular weight DNA fragmentation could be distributed in the sub-diploid DNA population. No oligonucleosome-sized DNA fragments are detected by agarose gel electrophoresis in cells treated with CPT and TPCK at 16 h (data not shown). In contrast, the sub-diploid DNA peaks are fairly similar in CPT + z-VAD-fmk treated cells ranging from 2% (at 0 h) to 8% (at 16 h) (Fig. 6, right). Moreover, passage of these cells through G<sub>2</sub> is slowed, an observation that confirm the reported reversible inhibitory effects of CPT on DNA synthesis and DNA replication (48). Moreover, these cells accumulate at the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. Cell cycle phase distributions shown in Fig. 6 (right) are 49% G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>, 29 % S and 19% G<sub>2</sub> at 0 h and 68% G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>, 20 % S and 3 % G<sub>2</sub>, 16 h after CPT + z-VAD-fmk treatment. These results suggest that caspase inhibition in these cells may restore or unmask G<sub>1</sub> cell cycle checkpoints following CPT treatment.

#### **Effect of z-VAD-fmk and TPCK in a reconstituted cell-free system.**

To further investigate the observations made *in vivo*, a reconstituted cell-free system was used where isolated nuclei obtained from control cells are incubated in the presence of control or activated cytosolic extracts obtained 4 h after CPT



treatment. Incubation was done in the presence or absence of TPCK, Ac-DEVD-CHO, zVAD-COOH (zVAD-fmk with carboxylesterase) and the benzyloxycarbonyl- derivatives zVA-OH, zV-OH, z-NHNH<sub>2</sub> and esterase alone. First, DEVDase activity in these extracts was monitored in the absence and presence of the inhibitors at various concentrations . Fig. 7 (top) shows that addition of zVA-OH, zV-OH, z-NHNH<sub>2</sub> and carboxylesterase alone does not inhibit DEVDase activity while Ac-DEVD-CHO and zVAD-COOH (zVAD-fmk + carboxylesterase) abrogate completely DEVDase activity. At 10  $\mu$ M and 100  $\mu$ M, TPCK has a weak inhibitory effect on DEVDase activity, while 300  $\mu$ M TPCK inhibit more than 60% of DEVDase activity (Fig. 7, top). When added to purified nuclei, these activated cytosol extracts trigger the oligonucleosome-sized DNA fragmentation in the reconstituted cell-free system (Fig. 7, bottom). However, these extracts do not digest plasmid DNA suggesting the requirement for nuclear factors to cause DNA fragmentation (results not shown). TPCK, at concentrations that do not interfere significantly with DEVDase activity, abolishes the occurrence of oligonucleosome-sized DNA fragmentation. These results suggest that TPCK-sensitive activities are involved in oligonucleosome-sized DNA fragmentation pathway. Under the same conditions, high concentrations of the tetrapeptide aldehyde derivative Ac-DEVD-CHO does not affect DNA fragmentation in the reconstituted cell-free system showing that inhibition of DEVDase activities in this cell free-system is not sufficient to abolish DNA fragmentation. These observations

suggest that other DNA fragmentation promoting factors are already activated in these extracts and are not inhibited by Ac-DEVD-CHO. Surprisingly, zVAD-COOH abolished the oligonucleosome-sized DNA fragmentation under the same conditions whereas Ac-DEVD-CHO had no effect. To delineate more precisely the inhibitory effect of zVAD-COOH upon DNA fragmentation, we tested whether the benzyloxycarbonyl- derivatives zVA-OH, zV-OH, z-NHNH<sub>2</sub> and esterase alone show similar effects. Interestingly, we observed that benzyloxycarbonyl compounds cause a marked reduction of the oligonucleosome-sized DNA fragmentation even at the lowest concentration tested (Fig. 7, bottom). Taken together, these observations show that the benzyloxycarbonyl- group inhibits oligonucleosome-sized DNA fragmentation without affecting DEVDase activity.

In summary, our results show that caspase activation initiates the apoptotic processes including morphological changes associated with CPT-induced apoptosis and a high molecular DNA fragmentation pathway that must involve activation of DNA fragmentation promoting factors. Blocking DEVDase activity in CPT-treated cells causes a transient G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest of these cells. Moreover, the oligonucleosome-sized DNA fragmentation during apoptosis involved TPCK- and benzyloxycarbonyl- sensitive activities that act downstream of DEVDase activity.

## DISCUSSION

Antitumour agents including the DNA topoisomerase I inhibitor CPT can trigger cell growth arrest or rapidly activate apoptosis and DNA degradation in various cell lines (48, 49). The HL-60 and U-937 cell lines are commonly used cell systems to understand the molecular events that trigger p53-independent apoptosis following DNA damage. These cell lines are highly sensitive to DNA topoisomerase inhibitors and undergo rapidly apoptosis after short drug treatment (9,11,36). Although apoptotic cells undergo similar cellular and nuclear changes following physiological and non-physiological induction, it is clear now that the mechanisms by which these changes occurred, may vary depending on the stimuli that trigger apoptosis but also on the intrinsic cellular context to which those stimuli are applied. Previous studies by others have shown that DNA fragmentation in thymocytes and rat liver nuclei involves a cleavage into high molecular weight DNA fragments of approximately 200-300 and 30-50 kbp, followed by subsequent cleavage into internucleosomal DNA fragments (29, 50, 51). According to the cell line used, apoptosis takes place with cleavage of DNA into high molecular weight fragments prior to or without oligonucleosome-sized DNA fragmentation (52). Thus, internucleosomal DNA fragmentation represents a form of DNA cleavage that is dispensable, though prevalent in many cell types undergoing apoptosis. This suggests that the

morphological changes associated with apoptosis, characterized by cell shrinkage, cytoplasm blebbing and chromatin condensation are not necessarily followed by internucleosomal DNA fragmentation and would instead imply higher order of DNA cleavage into 45-50 kbp fragments (42, 43). Our results with CPT-induced apoptosis in the presence or absence of inhibitors are consistent with those observations and show that blocking the internucleosomal DNA fragmentation does not affect morphological changes associated with apoptosis while blocking caspase activity and higher order of DNA fragmentation abrogates completely those morphological changes typical of apoptosis.

Apoptotic cell death induction by various stimuli involves cytosolic proteolytic cascade that is associated with pathway of endonuclease activation that is responsible for DNA cleavage. Ced3/Ice-like cysteine proteases or caspases have been identified and proposed to play a pivotal role in executing cell death (18, 45, 47), and more recently caspase 3 was reported to activate DFF, a protein associated with DNA fragmentation pathway in human cells (27). In murine, caspase 3 cleaved and inactivated ICAD, the murine counterpart of DFF45, a protein that binds and inhibits CAD, a protein with DNase activity (53-54). The human CAD-like homologue is not identified yet and whether TPCK and benzyloxycarbonyl interfere with these activities is unknown. Active serine-like proteases have also been proposed to play an essential role in apoptosis induced by DNA topoisomerase inhibitors (23, 28-35). TNF and UV

light also induce expression of a 24-kD serine protease that activates DNA fragmentation (30) and more recently others have reported partial purification of cytoplasmic serine proteinase potently involved in apoptosis (55). In the present study, we showed that the two stages of DNA fragmentation can be separated experimentally by using specific inhibitors. Our results in cultured cells and cell-free system show that *downstream* of DEVDase activity and high molecular weight DNA fragmentation, TPCK- and benzyloxycarbonyl-sensitive activities are involved in oligonucleosome-sized DNA fragmentation pathway. In treated cells, inhibition of caspase activity by zVAD-fmk prevents the morphological changes and DNA fragmentation typical of apoptosis. However, in cell-free system using activated cytosolic extracts, we observed that although Ac-DEVD-CHO and zVAD-COOH inhibit caspase activity, their effects upon DNA fragmentation were strikingly different. Ac-DEVD-CHO was unable to prevent DNA fragmentation while zVAD-COOH and other benzyloxycarbonyl- derivatives abrogate markedly the oligonucleosome-sized DNA fragmentation. These observations suggest that besides its effect on caspase activity, zVAD-fmk must inhibit other benzyloxycarbonyl-sensitive activities involved with DNA fragmentation *in vivo*. Interestingly, benzyloxycarbonyl-protected peptide derivatives are routinely synthesized because of the protective effect conferred by benzyloxycarbonyl upon endopeptidase degradation (56). The cellular targets of TPCK and benzyloxycarbonyl in these extracts are not identified yet but may

be part of the DFF/CAD-like system. Further studies to purify and characterize these activities are under way.

Blocking caspase activities and therefore other benzyloxycarbonyl-sensitive activities by zVAD-fmk in CPT-treated U-937 cells prevents apoptosis and causes an accumulation of these cells at the  $G_0/G_1$  phase of the cell cycle. Current anticancer drugs including DNA topoisomerase inhibitors can perturb the orderly progress of DNA replication and cell division (57). Mammalian cells possess complex mechanisms to regulate the progression of the cell cycle and cell cycle checkpoints are key cell cycle events that tightly control transition of cells from one phase of the cycle to the next one (58-60).  $G_1$  checkpoints are activated by DNA damage and incompletely replicated DNA to prevent cells from undergoing replication. Although the molecular events associated with the  $G_1$  arrest in these cells are not characterized in this study, the observation would suggest that blocking caspase activity following drug-mediated DNA damage may restore effective cell cycle checkpoints in these cells, perhaps by preventing caspase-dependent cleavage of cell cycle regulatory proteins.

**Acknowledgments.** R.B. is supported by funds from the Medical Research Council of Canada and by the National Cancer Institute of Canada with funds from the Canadian Cancer Society. R.B is a scholar of the Medical Research Council of Canada and the Research Cancer Society Inc. A.T.S is a recipient of a Canderel fellowship from the Institut du cancer de Montreal.

**REFERENCES**

1. Wyllie, A. H., The genetic regulation of apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, *5*, 97-104, 1995.
2. White, E., Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Develop.*, *10*, 1-15, 1996.
3. Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C., Programmed cell death in animal development. *Cell*, *88*, 347-354, 1997.
4. Carson, D. A., and Ribeiro, J. M., Apoptosis and disease. *Lancet*, *341*, 1251-4, 1993.
5. Thompson, C. B., Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, *267*, 1456-62, 1995.
6. Korsmeyer, S. J., Regulators of cell death. *Trends Genet.*, *11*, 101-5, 1995.
7. Pantaleo, G., and Fauci, A., Apoptosis in HIV infection. *Nature Med.*, *1*, 118-120, 1995.
8. Stefanis, L., Burke, R. E., and Greene, L. A., Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Curr. Opin. Neurol.*, *10*, 299-305, 1997.
9. Kaufmann, S. H., Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res.*, *49*, 5870-5878, 1989.



10. Barry, M. A., Behnke, C. A., and Eastman, A., Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.*, *40*, 2353-2362, 1990.
11. Bertrand, R., Sarang, M., Jenkin, J., Kerrigan, D., and Pommier, Y., Differential induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor cell lines with amplified c-myc expression. *Cancer Res.*, *51*, 6280-6285, 1991.
12. Del Bino, G., and Darzynkiewicz, Z., Camptothecin, Teniposide, or 4'-(9-acridinylamino)-3-methanesulfon-m-anisidide, but not mitoxantrone or doxorubicin, induces degradation of nuclear DNA in the S-phase HL-60 cells. *Cancer Res.*, *51*, 1165-1169, 1991.
13. Walker, P. R., Smith, C., Youdale, T., Leblanc, J., Whitfield, J. F., and Sikorska, M., Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res.*, *51*, 1078-1085, 1991.
14. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.*, *26*, 239-257, 1972.
15. Wyllie, A. H., Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, *284*, 555-556, 1980.
16. Pandey, S., Walker, P. R., and Sikorska, M., Separate pools of endonuclease activity are responsible for internucleosomal and high

- molecular mass DNA fragmentation during apoptosis. *Biochem. Cell. Biol.*, *72*, 625-629, 1994.
17. Pandey, S., Walker, P. R., and Sikorska, M., Identification of a novel 97 kda endonuclease capable of internucleosomal DNA cleavage. *Biochem.*, *36*, 711-720, 1997.
  18. Alnemri, E. S., Mammalian Cell Death Proteases - a Family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J. Cell. Biochem.*, *64*, 33-42, 1997.
  19. Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E. S., CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, *269*, 30761-4, 1994.
  20. Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., Poirier, G. G., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M., Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*, *81*, 801-9, 1995.
  21. Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A., Munday, N. A., Raju, S. M., Smulson, M. E., Yamin, T. T., Yu, V. L., and Miller, D. K., Identification and inhibition of the Ice/Ced-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, *376*, 37-43, 1995.

22. Datta, R., Banach, D., Kojima, H., Talanian, R. V., Alnemri, E. S., Wong, W. W., and Kufe, D. W., Activation of the Cpp32 protease in apoptosis induced by 1-Beta-D-arabinofuranosylcytosine and other DNA-damaging agents. *Blood*, 88, 1936-1943, 1996.
23. Dubrez, L., Savoy, I., Hamman, A., and Solary, E., Pivotal role of a DEVD-sensitive step in etoposide-induced and Fas-mediated apoptotic pathways. *EMBO J.*, 15, 5504-5512, 1996.
24. Martins, L. M., Kottke, T., Mesner, P. W., Basi, G. S., Sinha, S., Frigon, N., Tatar, E., Tung, J. S., Bryant, K., Takahashi, A., Svingen, P. A., Madden, B. J., McCormick, D. J., Earnshaw, W. C., and Kaufmann, S. H., Activation of multiple Interleukin-1-Beta converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 272, 7421-7430, 1997.
25. Macfarlane, M., Cain, K., Sun, X. M., Alnemri, E. S., and Cohen, G. M., Processing/Activation of at least four Interleukin-1-Beta converting enzyme-like proteases occurs during the execution phase of apoptosis in human monocytic tumor cells. *J. Cell Biol.*, 137, 469-479, 1997.
26. Shimizu, T., and Pommier, Y., Camptothecin-induced apoptosis in P53-null human leukemia HL60 cells and their isolated nuclei - Effects of the protease inhibitors z-VAD-fmk and dichloroisocoumarin suggest an involvement of both caspases and serine proteases. *Leukemia*, 11, 1238-1244, 1997.

27. Liu, X. S., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. D., DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89, 175-184, 1997.
28. Bruno, S., Del Bino, G., Lassota, P., Giaretti, W., and Darzynkiewicz, Z., Inhibitors of proteases prevent endonucleolysis accompanying apoptotic death of HL-60 leukemic cells and normal thymocytes. *Leukemia*, 6, 1113-20, 1992.
29. Weaver, V. M., Lach, B., Walker, P. R., and Sikorska, M., Role of proteolysis in apoptosis: involvement of serine proteases in internucleosomal DNA fragmentation in immature thymocytes. *Biochem. Cell Biol.*, 71, 488-500, 1993.
30. Wright, S. C., Wei, Q. S., Zhong, J., Zheng, H., Kinder, D. H., and Larrick, J. W., Purification of a 24-kD protease from apoptotic tumor cells that activates DNA fragmentation. *J. Exp. Med.*, 180, 2113-23, 1994.
31. Ghibelli, L., Maresca, V., Coppola, S., and Gualandi, G., Protease inhibitors block apoptosis at intermediate stages - A compared analysis of DNA fragmentation and apoptotic nuclear morphology. *FEBS Lett.*, 377, 9-14, 1995.
32. Yoshida, A., Takauji, R., Inuzuka, M., Ueda, T., and Nakamura, T., Role of serine and ICE-Like proteases in induction of apoptosis by

- etoposide in human leukemia HL-60 cells. *Leukemia*, *10*, 821-824, 1996.
33. Hara, S. S., Halicka, H. D., Bruno, S., Gong, J. P., Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z., Effect of protease inhibitors on early events of apoptosis. *Exp. Cell Res.*, *223*, 372-384, 1996.
34. Adjei, P. N., Kaufmann, S. H., Leung, W. Y., Mao, F., and Gores, G. J., Selective induction of apoptosis in Hep 3b cells by topoisomerase I inhibitors - Evidence for a protease-dependent pathway that does not activate cysteine protease P32. *J. Clin. Invest.*, *98*, 2588-2596, 1996.
35. Zhu, H., Dinsdale, D., Alnemri, E. S., and Cohen, G. M., Apoptosis in human monocytic THP.1 cells involves several distinct targets of N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone. *Cell Death Diff.*, *4*, 590-599, 1997.
36. Sané, A. T., Schmitt, E., Steyaert, A., Meyer, D., and Bertrand, R., The CrmA- and TPCCK-sensitive pathways that trigger the oligonucleosome-sized DNA fragmentation in camptothecin-induced apoptosis; relation to caspase activation and high molecular weight DNA fragmentation. *Biochem. Cell. Biol.*, *75*, 359-368, 1997.
37. Miller, S. A., Dykes, D. D., and Polesky, H. F., A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acid. Res.*, *16*, 1215-, 1988.

38. Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K. W., and Pommier, Y., Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp. Cell Res.*, *211*, 314-21, 1994.
39. Solary, E., Bertrand, R., Kohn, K. W., and Pommier, Y., Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Blood*, *81*, 1359-68, 1993.
40. Alnemri, E. S., and Litwack, G., Activation of internucleosomal DNA cleavage in human CEM lymphocytes by glucocorticoid and novobiocin. Evidence for a non-Ca<sup>2+</sup>(+)-requiring mechanism(s). *J.Biol.Chem.*, *265*, 17323-17333, 1990.
41. Walker, P. R., and Sikorska, M., Endonuclease activities, chromatin structure, and DNA degradation in apoptosis. *Biochem. Cell Biol.*, *72*, 615-23, 1994.
42. Beere, H. M., Chresta, C. M., Alejo-Herberg, A., Skladanowski, A., Dive, C., Larsen, A. K., and Hickman, J. A., Investigation of the mechanism of higher order chromatin fragmentation observed in drug-induced apoptosis. *Mol. Pharmacol.*, *47*, 986-96, 1995.
43. Rusnak, J. M., Calmels, T. P. G., Hoyt, D. G., Kondo, Y., Yalowich, J. C., and Lazo, J. S., Genesis of discrete higher order DNA fragments in apoptotic human prostatic carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.*, *49*, 244-252, 1996.

44. Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C., Role of Ced3/Ice-Family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. *J. Cell Biol.*, *133*, 1041-1051, 1996.
45. Kumar, S., and Harvey, N. L., Role of multiple cellular proteases in the execution of programmed cell death. *FEBS Lett.*, *375*, 169-173, 1995.
46. Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J., Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, *87*, 171, 1996.
47. Patel, T., Gores, G. J., and Kaufmann, S. H., The role of proteases during apoptosis. *FASEB J.*, *10*, 587-597, 1996.
48. Gupta, M., Fujimori, A., and Pommier, Y., Eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochim. Biophys. Acta*, *1262*, 1-14, 1995.
49. Pommier, Y., Leteurtre, F., Fesen, M. R., Fujimori, A., Bertrand, R., Solary, E., Kohlhagen, G., and Kohn, K. W., Cellular determinants of sensitivity and resistance to DNA topoisomerase inhibitors. *Cancer Invest.*, *12*, 530-42, 1994.
50. Cain, K., Inayat-Hussain, S. H., Kokileva, L., and Cohen, G. M., DNA cleavage in rat liver nuclei activated by  $Mg^{2+}$  or  $Ca^{2+} + Mg^{2+}$  is inhibited by a variety of structurally unrelated inhibitors. *Biochem. Cell Biol.*, *72*, 631-8, 1994.
51. Cain, K., Inayat-Hussain, S. H., Wolfe, J. T., and Cohen, G. M., DNA fragmentation into 200-250 and/or 30-50 kilobase pair fragments in rat

- liver nuclei is stimulated by  $Mg^{2+}$  alone and  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  but not by  $Ca^{2+}$  alone. *FEBS Lett.*, *349*, 385-91, 1994.
52. Oberhammer, F., Wilson, J. W., Dive, C., Morris, I. A., Hickman, J. A., Wakeling, A. E., Walker, P. R., and Sikorska, M., Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.*, *12*, 3679-3684, 1993.
53. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S., A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, *391*, 43-50, 1998.
54. Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S., Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, *391*, 96-99, 1998.
55. Suzuki, A., Iwasaki, M., and Wagai, N., Involvement of cytoplasmic serine proteinase and Cpp32 subfamily in the molecular machinery of caspase 3 activation during Fas-mediated apoptosis. *Exp. Cell Res.*, *233*, 48-55, 1997.
56. Wolman, Y., Ladkany, D., Frankel, M., Synthesis of activated esters of N-protected amino-acids. *J. Chem. Soc. Perkin Transaction 1*, *8*, 689-690, 1967.
57. O'Connor, P. M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T. G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D. A., Monks, A., Sausville, E. A., Weinstein, J. N., Friend,



- S., Fornace, A. J., and Kohn, K. W., Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res.*, *57*, 4285-4300, 1997.
58. Hartwell, L. H., and Kastan, M. B., Cell cycle control and cancer. *Science*, *266*, 1821-8, 1994.
59. Kohn, K. W., Jackman, J., and O'Connor, P. M., Cell cycle control and cancer chemotherapy. *J. Cell Biochem.*, *54*, 440-452, 1994.
60. Kaufmann, W. K., and Paules, R. S., DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB J.*, *10*, 238-247, 1996.

## FIGURE LEGENDS

**Fig 1. The effect of TPCK upon oligonucleosome-sized and high molecularweight DNA fragmentation induced by CPT.**

U-937 cells were treated with CPT (1.0  $\mu$ M; 30 min) in the absence (top) and presence of 10  $\mu$ M TPCK (bottom). At indicated times after drug treatment (*Lane numbers*, times in h), DNA fragmentation was analyzed by standard agarose gel electrophoresis (left) and TAFE (right). Following electrophoresis DNA was visualized by ethidium bromide staining.

**Fig 2. The effect of zVAD-fmk upon oligonucleosome-sized and highmolecular weight DNA fragmentation induced by CPT.**

U-937 cells were treated with CPT (1.0  $\mu$ M; 30 min) in the absence or presence of 100  $\mu$ M (top) and 300  $\mu$ M zVAD-fmk (bottom). At indicated times after drug treatment (*Lane numbers*, times in h), DNA fragmentation was analyzed by standard agarose gel electrophoresis (left) and TAFE (right). Following electrophoresis DNA was visualized by ethidium bromide staining.

**Fig 3. The effect of TPCK and zVAD-fmk on caspase activities in CPT treated U-937 cells.**

At the indicated times following CPT treatment (1.0  $\mu\text{M}$ , 30 min) in the absence or presence of TPCK (10  $\mu\text{M}$ ) and zVAD-fmk (300  $\mu\text{M}$ ), DEVD-AMC hydrolysis was measured by fluorospectrometry. Enzyme activities were measured as initial velocities and expressed as relative intensity / min / mg. *Data points*, means of three independent determinations; *bars*, SD. ■ CPT; ▼, CPT + TPCK; and ◆, CPT + zVAD-fmk.

**Fig 4. The effect of TPCK and zVAD-fmk on cell proliferation and metabolic activity after CPT treatment.**

Control (●) and CPT-treated cells (■) with 10  $\mu\text{M}$  TPCK (▼) or 300  $\mu\text{M}$  zVAD-fmk (◆) were assessed for viability by trypan blue dye exclusion assays (left) and MTT-based colorimetric assays (right). *Data points*, means of four (left) and three (right) independent determinations; *bars*, SD.

**Fig 5. The effects of TPCK and zVAD-fmk on cellular morphology after CPT-treatment.**

Electron micrographs of control and CPT-treated U-937 cells without or with TPCK and zVAD-fmk. Cells were collected and processed for electron microscopy 4 h after drug treatment.

**Fig 6. The effects of TPCK and zVAD-fmk on cell cycle progression after CPT treatment.**

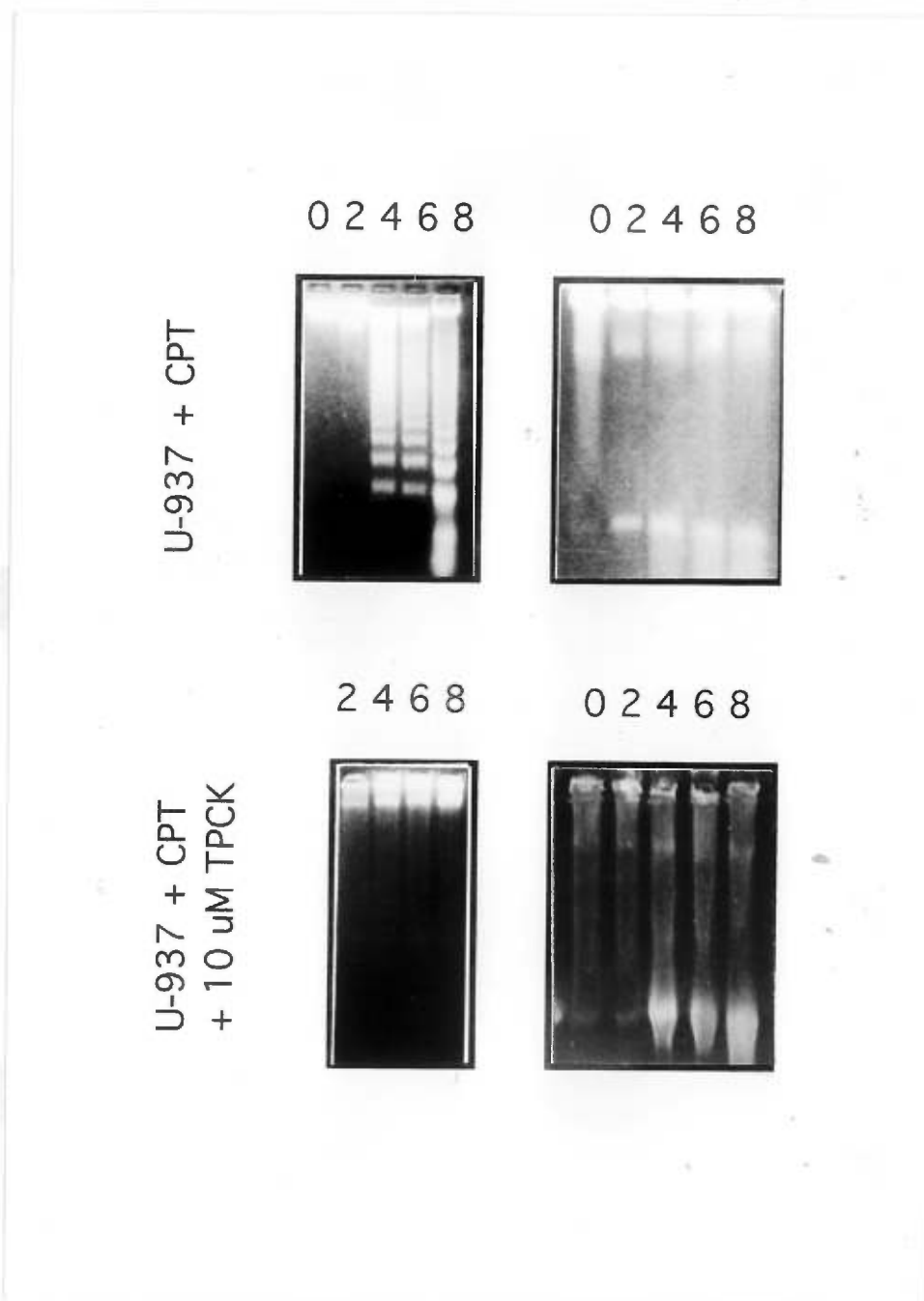
At the indicated times after CPT treatment (1.0  $\mu$ M; 30 min) in the absence or presence of TPCK (10  $\mu$ M) or zVAD-fmk (300  $\mu$ M), cells were processed for flow cytometry analysis. DNA content and cell cycle distribution were analyzed using a Becton-Dickinson FACSTAR Plus flow cytometer after propidium iodine staining.

**Fig 7. DEVDase and DNA fragmentation promoting activities in cytosolic extracts obtained from CPT-treated U-937 cells.**

Activated cytosolic extracts were prepared 4 h after CPT treatment (1.0  $\mu$ M). TPCK, Ac-DEVD-CHO, zVAD-COOH (zVAD-fmk + 20  $\mu$ g / ml

carboxylesterase), zVA-OH , zV-OH, z-NHNH<sub>2</sub> and esterase alone (20 µg / ml) were added into activated cytosolic extracts. DEVD-AMC hydrolysis activity (top) and DNA fragmentation promoting activity on purified nuclei (bottom) were measured. Concentrations of the inhibitors are 300 µM (left), 100 µM (middle) and 10 µM (right). DEVDase activity is expressed as percent relative enzyme activities  $(v_i / v_0) \times 100$ . DNA fragmentation was analyzed by conventional agarose gel electrophoresis and DNA visualized by ethidium bromide staining.

Figure 1 : Sané et al.



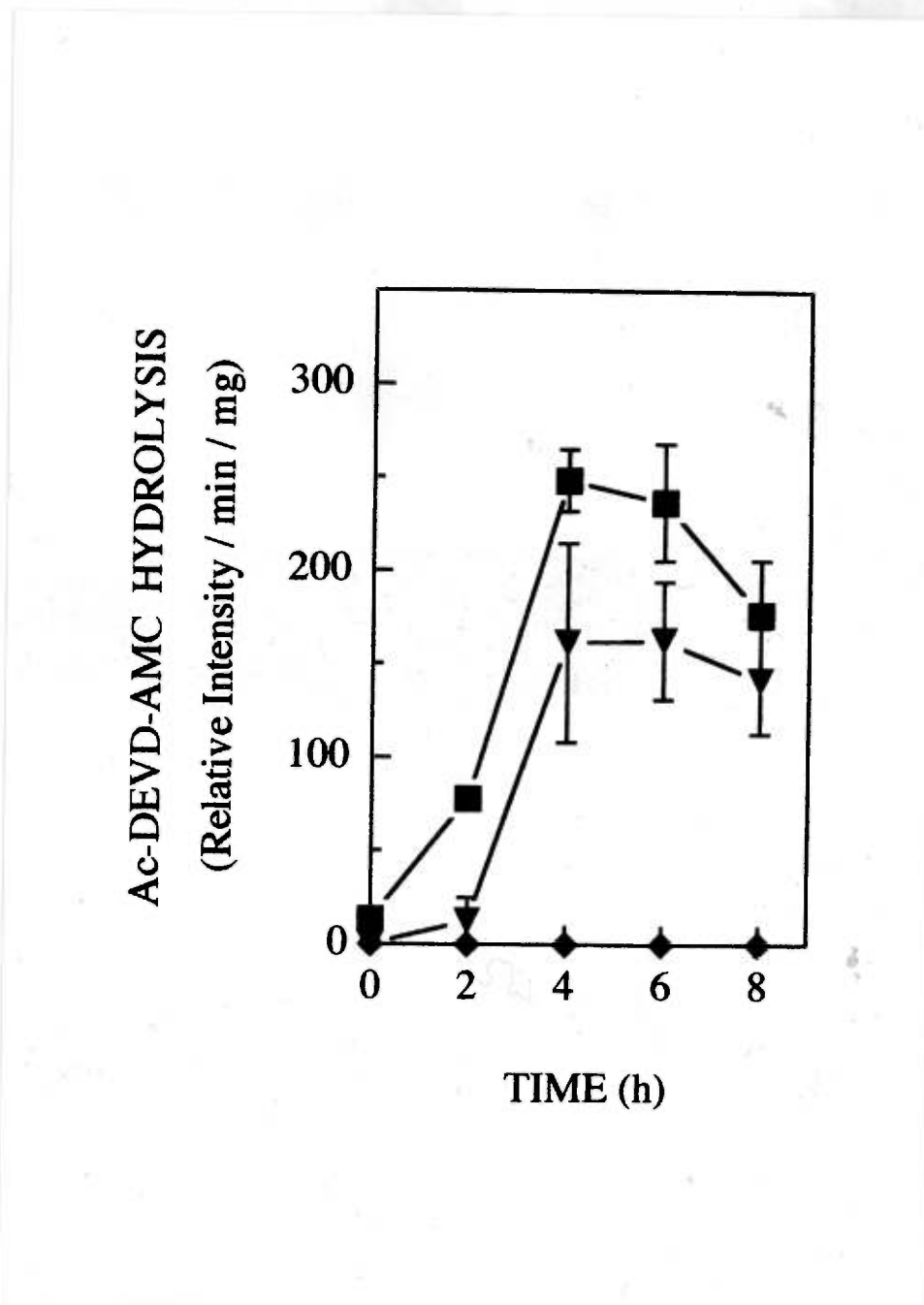
**Figure 3** : Sané et al.

Figure 4 : Sané et al.

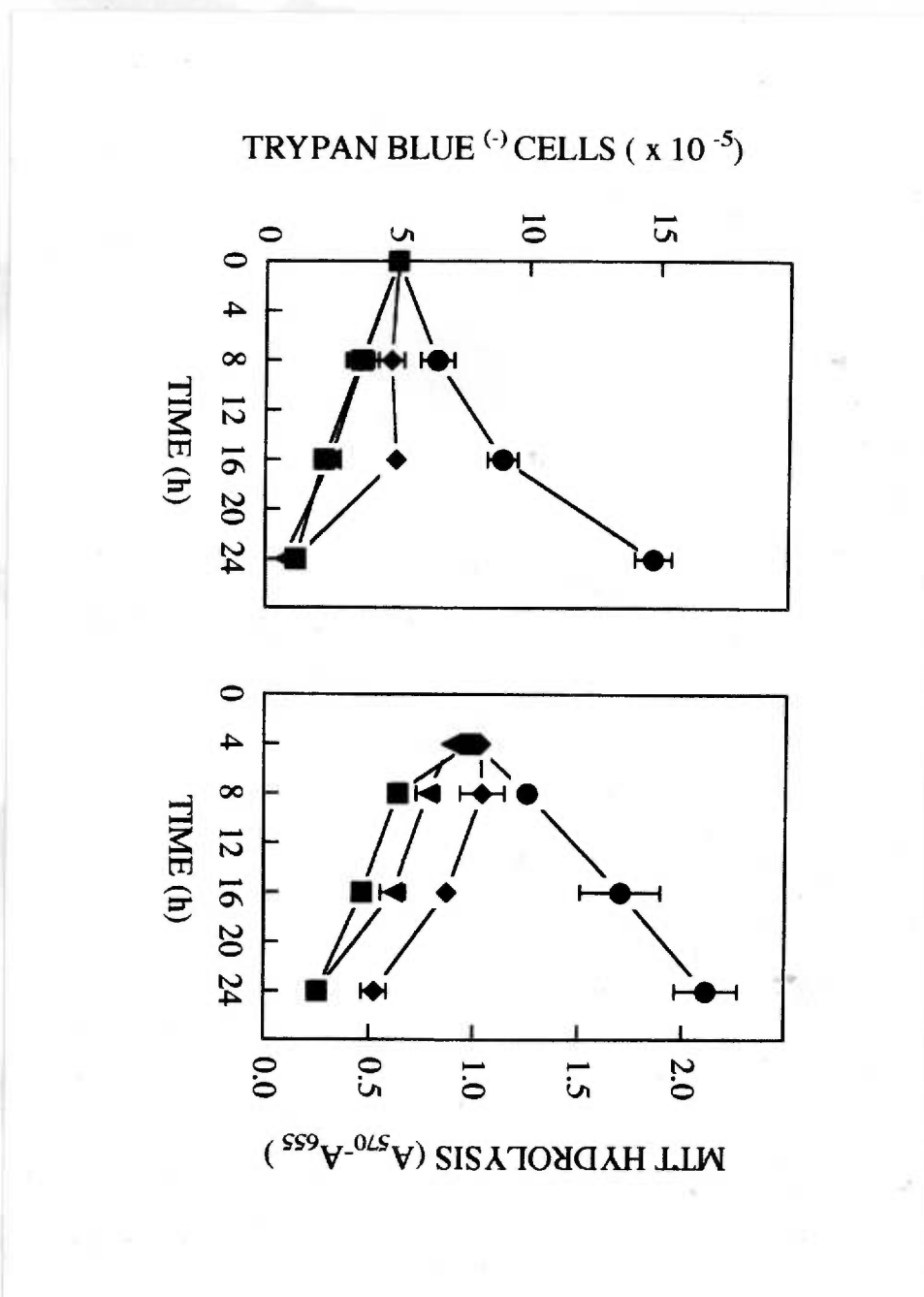
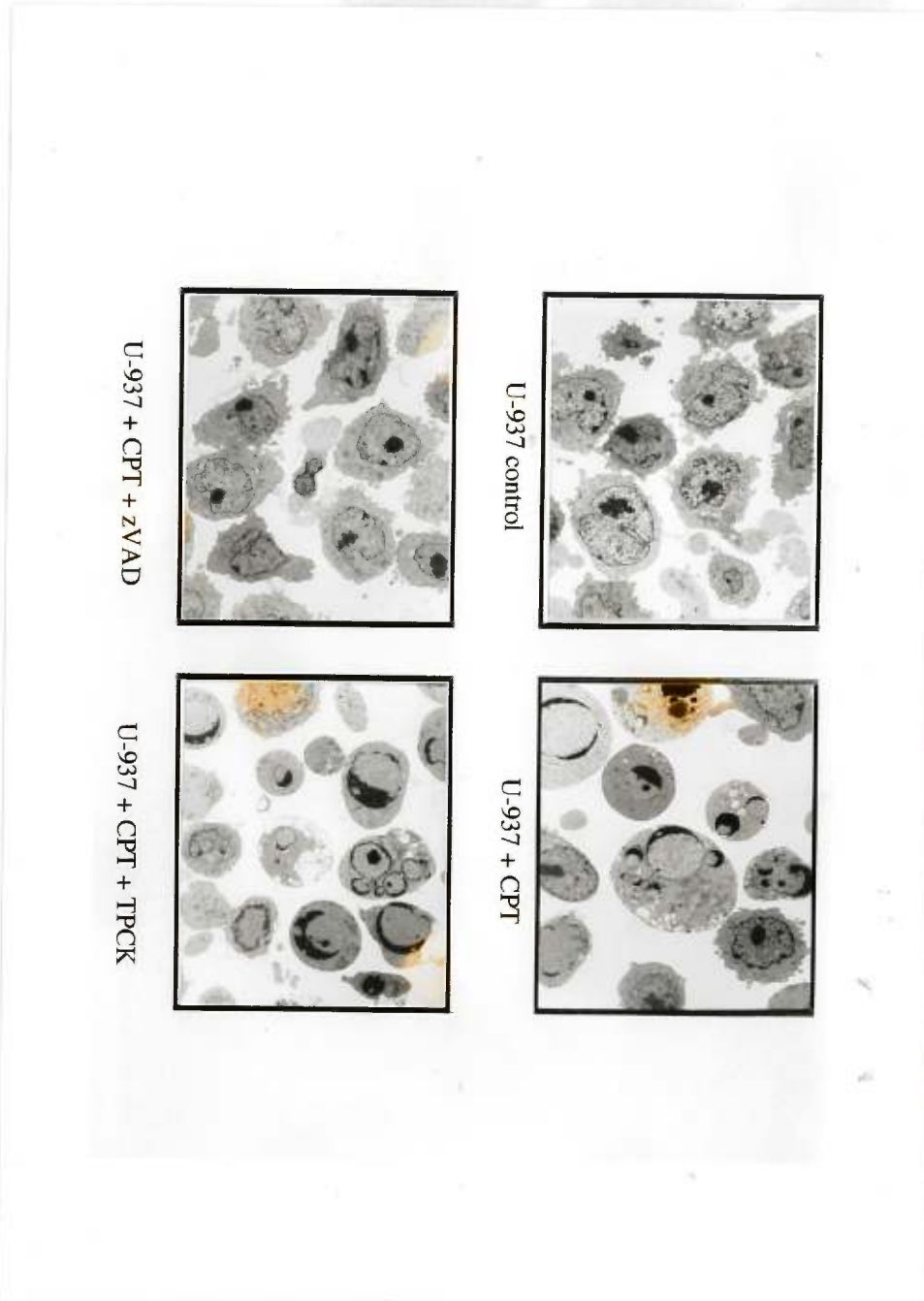




Figure 5 : Sané et al.



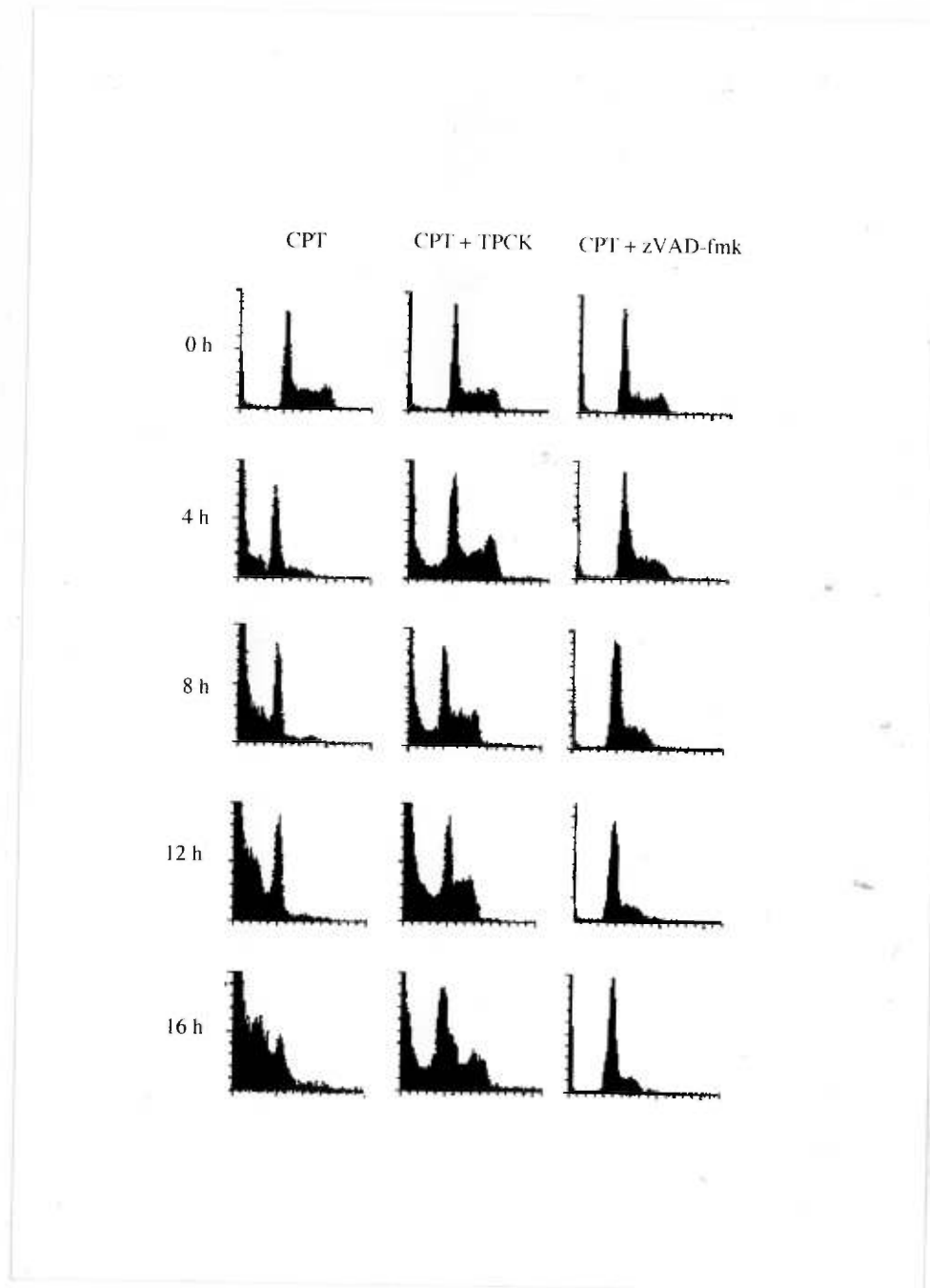
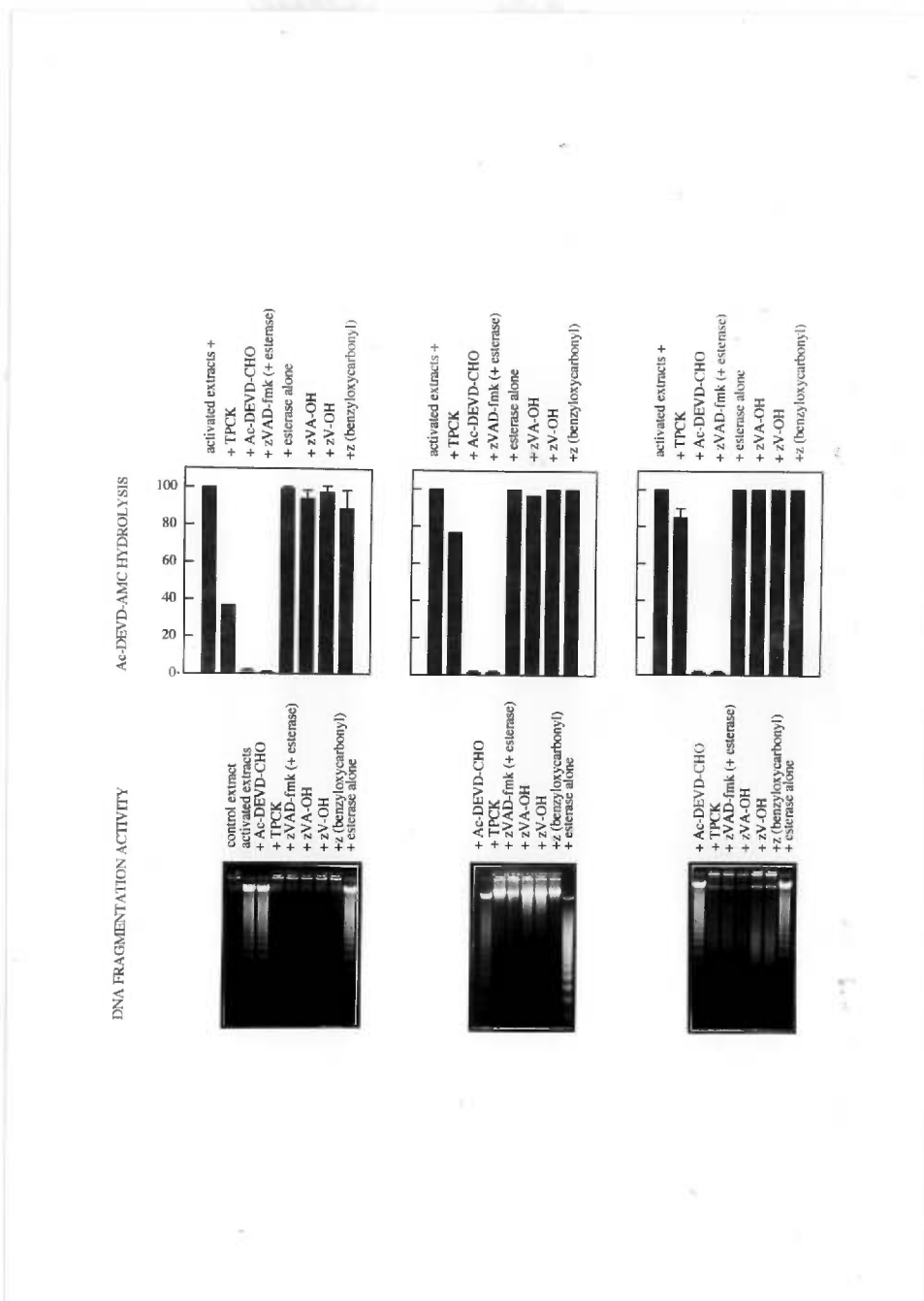
**Figure 6** : Sané et al.

Figure 7 : Sané et al.



**2.3 Caspase inhibition in camptothecin-treated U-937 cells is coupled with a shift from apoptosis to transient G<sub>1</sub> arrest followed by necrotic cell death (In press, Cancer Research 59, july 1999)**

Alain-Théophile Sané and Richard Bertrand <sup>(1)</sup>

Hospital Research Center of University of Montreal (CHUM), Notre-Dame Hospital, Montreal Cancer Institute, Montreal (Que) H2L 4M1 Canada

(1)To whom correspondence should be addressed; Hospital Research Center of University of Montreal (CHUM), Notre-Dame Hospital, Montreal Cancer Institute (Room Y-5634), 1560 Sherbrooke St. East, Montreal (Que) H2L 4M1 Canada.

Phone: (514) 281 6000 ext 6615;

Fax: (514) 896 4689;

Email: r\_bertrand@videotron.ca

The abbreviations used are: CPT, 20-S-camptothecin lactone; top 1; DNA topoisomerase 1; top 2, DNA topoisomerase II; cdk, cyclin dependent kinase; cdki, cyclin dependent kinase inhibitor; zVAD-fmk, benzyloxycarbonyl- Val-Ala-Asp(Ome)- fluoromethyl ketone; Ac-DEVD-AMC, Ac-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-methylcoumarin; DEVDase, Asp-Glu-Val-Asp ase; TAFE, transverse alternating pulsed field electrophoresis; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; NP-40, NonidetP-40; DTT, dithiothreitol.

**ABSTRACT**

Leukemia U-937 cells rapidly undergo characteristic morphological changes, caspase activation and DNA fragmentation typical of apoptosis upon treatment with the DNA topoisomerase I inhibitor camptothecin (CPT). In a previous report, we showed that caspase inhibition by the tripeptide derivative benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethyl ketone (zVAD-fmk) after CPT treatment, blocked apoptosis and slowed passage of the cells through S/G<sub>2</sub> and caused a transient accumulation of these cells at the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle [Cancer Res 58, 3066-3072, 1998]. Accumulation of these cells at the G<sub>1</sub> phase is not associated with major changes in expression level of cdk2, cdk4, cdk6 or cyclin D1 and cyclin E or p16, p21, p27 and p57 after CPT treatment. Furthermore, cdk2, cdk4 and cdk6 kinase activities remain unaffected after CPT treatment. These results indicate that the G<sub>1</sub> arrest of these cells does not correlate with a classical driven cell cycle checkpoint but with the known effect of CPT in mediating inhibition of DNA replication and RNA transcription following stabilization of topoisomerase I-linked DNA strand breaks. However, persistent caspase inhibition after CPT treatment results also with cells falling into necrosis after the transient G<sub>1</sub> arrest. These results indicate that enforced inhibition of caspase activities does not confer a survival advantage for CPT-treated cells but is coupled with a shift from apoptosis to transient G<sub>1</sub> arrest followed by massive necrosis.

## INTRODUCTION

DNA topoisomerase I and II inhibitors are cytotoxic anticancer drugs that stabilize a transient intermediate of topoisomerase reactions where enzymes are linked to the 3' (top 1) or 5' (top 2) terminus of a DNA duplex producing DNA single- or double-strand breaks. These topoisomerase-linked DNA strand breaks are reversible pre-lethal lesions that inhibit DNA metabolism such as replication and transcription (1, 2). Although reversible, topoisomerase-linked DNA strand breaks signal G<sub>1</sub> or G<sub>2</sub> cell cycle checkpoints in some cells but induce rapidly apoptosis in others, with activation of aspartic acid-specific cysteine proteases known as caspases (3-12). Caspase activities drive proteolysis of specific homeostatic and structural proteins that results in an irreversible commitment of cells to undergo apoptosis (13, 14). Many studies strongly suggest now that the mitochondrial pathway of caspase activation plays the central role in cell death induced by genotoxic drugs (15). Cells deficient in Apaf-1 or caspase-9 are protected from apoptosis induced by anticancer drugs (16, 17). The complex formation between cytochrome c, Apaf-1 and caspase 9 zymogen leads to the cleavage and activation of caspase 9 that in turn activates directly the effector caspase -3 and -7 (16, 17). Caspase 3 activity accounts for the proteolysis of several substrates including DFF/mICAD, which proteolysis releases DFF40/CPAN/mCAD which then enters the nucleus and initiates chromosomal DNA fragmentation (18-20). Caspase activation is associated also with morphological changes typical of apoptosis, characterized by cytoplasmic shrinkage, membrane blebbing, chromatin condensation and extensive DNA breakage (21).

In previous studies, we showed that inhibition of caspase activities by zVAD-fmk following CPT treatment, caused transient accumulation of the cells at the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle (12). In this study, we investigated the molecular determinants of the accumulation of these cells at G<sub>1</sub> phase and their fate after long term enforced inhibition of caspase activities following CPT treatment. We show that specific cyclins, cdks and cdkis which expression and activity are associated with G<sub>1</sub>-S transition, remain unaltered in caspase inhibited CPT-treated cells. These observations suggest that the accumulation of the cells at the G<sub>1</sub> boundary is associated with the effect of CPT in mediating inhibition of DNA replication and RNA transcription following stabilization of top 1-linked DNA strand breaks. We show also that the G<sub>1</sub> arrest was only transient and followed by massive necrosis in the caspase inhibited CPT-treated U-937 cells. Thus, inhibition of caspase activities in CPT-treated cells does not confer a survival advantage for CPT-treated cells but is coupled with a shift from apoptosis to transient G<sub>1</sub> arrest and massive necrosis.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Chemicals.** CPT was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The fluorogenic peptide derivative Ac-DEVD-AMC was purchased from Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA). The caspase inhibitor tripeptide derivative zVAD-fmk was purchased from Enzyme Systems Products (Livermore, CA). [Methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine (78 Ci/mmol) and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (> 4000 Ci/mmol) were purchased from ICN BioMedicals (Costa Mesa, CA). All other chemicals were of reagent grade and purchased either from Sigma and ICN or from other local sources.



**Cell culture and drug treatments.** The human U-937 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Cells were grown in suspension culture at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cell culture products were obtained from Gibco-BRL Life Technologies Inc. (Grand Island, NY). Exponentially growing cells were used throughout all experiments at a density of 5 X 10<sup>5</sup> cells/ml. Cells were treated with CPT at 1.0 µM in the absence or presence of 300 µM zVAD-fmk. Following a 30 min incubation at 37°C, cells were pelleted by centrifugation, washed, and resuspended in fresh medium with or without zVAD-fmk.

**Analysis of DNA content by flow cytometry.** Cells were centrifuged at 1 000 X g for 2 min and washed in ice-cold PBS. Cell pellets were fixed in 70% ethanol for 2 h at 4°C. After incubation, cells were pelleted by centrifugation and resuspended in a solution of 70% ethanol containing 150 µg/ml RNase A and incubated for 30 min at room temperature. Cells were then pelleted by centrifugation and resuspended in PBS. Propidium iodide (50 µg/ml) was added before cytofluorometry analysis. DNA content and cell cycle distribution were analyzed using a Becton Dickinson FACStar Plus flow cytometer (12).

**Determination of DEVDase activities.** Control and drug-treated U-937 cells were pelleted by centrifugation, washed twice in ice-cold PBS, and resuspended in lysis buffer containing 10 mM HEPES (pH 7.4), 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.15 units/ml aprotinin, 10% glycerol and 0.3% NP-40, as described previously (22). DEVDase activities were measured by continuous fluorescence monitoring in a dual-

luminescence fluorometer (model LS 50B; Perkin-Elmer) using an excitation wavelength of 380 nm and an emission wavelength of 460 nm. Reactions were carried out in cuvettes, and the temperature was maintained at 37°C using a water-jacketed sample compartment. The assay mixture contained 100 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 100  $\mu$ M fluorogenic peptide, and 200  $\mu$ g cytosolic extract. Enzyme activities were measured as initial velocities and expressed as relative intensity / min / mg (12).

**Analysis of DNA Fragmentation by agarose gel electrophoresis.** To visualize the oligonucleosome-sized DNA fragments cellular DNA was extracted by a salting-out procedure as previously described (5). Electrophoresis was done in 1.6% agarose gel in Tris-acetate buffer (pH 8.0). High molecular weight DNA fragments were analyzed by TAFE using a Beckman Geneline apparatus (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA). Agarose blocks containing cells were incubated for 24 h at 42°C in a solution containing 1.0 mg/ml proteinase K, 1% N-lauryl-sarcosine, 0.2% sodium deoxycholate and 100 mM EDTA (pH 8.0). The agarose-embedded DNA was soaked in TE buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA) before electrophoresis on a 1.2% agarose gel. Gels were subjected to a 30 min run at 170 V with a pulse time of 4 s, followed by a 24 h run at 150 V with a pulse time of 60 s. Electrophoresis was done at 18°C in TAFE buffer (10 mM Tris, 5 mM EDTA-free acid, and 0.025% (v/v) glacial acetic acid) (12). Following electrophoresis, DNA was visualized by ethidium bromide staining.

**Measurement of thymidine incorporation.** Control and drug-treated cells ( $2 \times 10^6$  cells) were collected and cell samples divided equally in two aliquots for thymidine incorporation assay and protein concentration determination. Rates

of thymidine incorporation were measured by 10 min pulse experiments with [<sup>3</sup>H]-thymidine (10 $\mu$ Ci/ml) incorporation as described. Nucleotide incorporation was stopped by adding 10 ml of ice-cold PBS and cells quickly pelleted by centrifugation. Acid-insoluble nucleotides were precipitated on ice with 10% trichloroacetic acid. Precipitates were dissolved in 0.4 N NaOH and radioactivity monitored by scintillation spectrometry. Total protein concentrations were determined using the Bradford assay (BioRad, Hercules CA). Rate of DNA synthesis was expressed as cpm / mg and data obtained from drug-treated cells expressed as relative to control cells (23).

**Western blot analysis.** Control and drug-treated cells were collected by centrifugation, washed once with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and then homogenized in a lysis buffer containing 5 mM HEPES pH 7.4, 160 mM KCl, 40 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0 mM PMSF, 1.0 mM DTT, 1.0% NP-40 and a cocktail of protease inhibitors (Complete<sup>TM</sup>, Boehringer- Mannheim) at 4°C for 30 min with gentle agitation. After centrifugation (10 000 X g, 10 min) supernatants were collected. Mouse monoclonal antibodies used for western blot analysis were cdk2 (D-12), cyclinD1 (R-124), p27 (F-8) from SantaCruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA), and p21 (Ab-1), p16 (Ab-1) from Oncogene Research Products (Cambridge, MA); rabbit polyclonal antibodies cdk6 (H-230), cdk4 (C-22) cyclinE (M-20) and goat polyclonal antibodies p57 (C-20)-G were from Santa Cruz Biotechnology. Immunoblot analysis was performed accordingly with the horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit or anti-goat antibodies using Enhanced Chemiluminescence (ECL) Western Blotting Detection Reagents (Amersham Life Science).

**Kinase assays.**  $2 \times 10^6$  control or drug-treated cells were pelleted and washed in ice-cold PBS. Cells were lysed on ice in PBS lysis buffer containing 10 mM sodium orthovanadate, 2 mM PMSF, 1 mg/ml aprotinin, 1% BSA, a cocktail of protease inhibitors (Complete<sup>TM</sup>, Boehringer- Mannheim) and 1% NP-40 for 30 min. Insoluble material was removed by centrifuging at 3 000 rpm for 15 min at 4°C. Supernatant was incubated with 2  $\mu$ g of either goat anti-Cdk2 (M-2), goat anti-Cdk4 (H-22), goat anti-Cdk6 (C-21) (Santa Cruz Biotechnology) and rabbit anti-cdc2/cdk1 (Ab-1) obtained from Calbiochem. Immune complexes were trapped by protein A/G Plus-Sepharose and pelleted by centrifugation. Pellets were resuspended and incubated for 20 min in 30  $\mu$ l kinase assay buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ M ATP, 10  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP and 5  $\mu$ g of purified histone H1 (Gibco-BRL) as substrate. Reactions were carried out at 37°C for 20 min, stopped by addition of 5  $\mu$ l 3 X concentrated electrophoresis Laemeli sample buffer and boiled for 5 min. Samples were centrifuged and the soluble fractions loaded on SDS-PAGE. Following electrophoresis, gels were dried and exposed to X-ray film.

**Electron microscopy.** Cells were centrifuged at 400 X g for 10 min and washed in ice-cold PBS. Cell fixation was performed in 0.1 M Millonig's phosphate buffer (pH 7.4; 292 milliosmoles) containing 2.5% glutaraldehyde. Staining was performed with 2% uranyl acetate, and dehydration was performed with several ethanol treatments. Sections (500-700 Å) were mounted on copper grids and stained in lead citrate. Samples were examined (JFE Enterprises, Brookville, MD) by transmission electron microscopy using a Ziess Em 10 CA microscope.

## RESULTS AND DISCUSSION

### **Effect of caspase inhibition by zVAD-fmk in CPT-treated U-937 cells.**

Short CPT treatment rapidly triggers apoptosis in U-937 cells (12). Flow cytometry analysis following CPT treatment indicates that cells do not accumulate in a specific phase of the cell cycle, but appear rapidly in a sub- $G_0/G_1$  peak. Approximately 60% and 80% of the cells are localized in the sub- $G_0/G_1$  peak 4 h and 8 h after CPT treatment, respectively (Fig. 1a, left panel). In CPT-treated cells, DEVDase activities, a measure of caspase -3, -7 and -2 activities (24), are rapidly detected after drug treatment (Fig. 1b, left panel). Caspase activities correlate also with the appearance of oligonucleosome-sized and high molecular weight DNA fragmentation visualized by ethidium bromide staining following standard agarose gel electrophoresis and TAFE, respectively (Fig. 1c, left panel). We reported previously that inhibition of caspase activities in CPT-treated cells by zVAD-fmk blocks apoptosis (12). In the presence of zVAD-fmk, passage through  $S/G_2$  of CPT-treated cells is slowed and approximately 60% of cells accumulate at the  $G_0/G_1$  phase of the cell cycle for at least 16 h (Fig. 1a, right panel). Sub- $G_0/G_1$  cells appear slowly 12 h after CPT-treatment in presence of zVAD-fmk, but increase dramatically between 16 h and 24 h post-treatment, with more than 80% of cells in sub- $G_0/G_1$  peak 24 h after treatment. The increase in sub- $G_0/G_1$  cell population correlates with the fall of  $G_0/G_1$  cell population (Fig. 1a, right panel). No DEVDase activities are detected in CPT-treated cells in presence of zVAD-fmk when cells accumulate in  $G_0/G_1$ . Moreover, when cells appear predominantly in sub- $G_0/G_1$  peak, DEVDase activities are still very low even 48 h after CPT treatment (Fig. 1b,

right panel). Caspase inhibition in U-937 cells following CPT treatment abrogated completely the oligonucleosome-sized and high molecular weight DNA fragmentation for at least for 8 h in U-937 cells (12). However, when cells appear in sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> peak, the presence of zVAD-fmk still completely abrogates the oligonucleosome-sized DNA fragmentation even 48 h after CPT treatment. In contrast, the presence of zVAD-fmk does not prevent the occurrence of high molecular weight DNA fragmentation 24 h and 48 h after CPT treatment (Fig. 1c, right panel). Occurrence of high molecular weight DNA fragments was observed previously in necrotic cell death (25). To investigate further the effects of persistent caspase inhibition by zVAD-fmk on CPT-induced apoptosis, electron micrographs were analyzed. Fig. 2 shows that CPT induces within 4 h characteristic morphological changes associated with the apoptotic phenotype, including chromatin condensation and cell shrinkage in U-937 cells. In contrast, the presence of zVAD-fmk in CPT-treated cells inhibits completely the morphological events associated with apoptosis 4 h after drug treatment. However, cytolysis with microscopic features of necrosis including disruption of the plasma membrane, vacuolization and scattered chromatin are observed 24 h following CPT treatment in presence of zVAD-fmk (Fig. 2). These observations show that caspase inhibition shifts the death mechanism predominantly to necrosis, apoptosis being governed by a caspase activation event (26, 27).

**Effect of zVAD-fmk on expression and activity of cell cycle-related proteins in CPT-treated U-937 cells.** Induction of cell cycle arrest in response to DNA damage is a well-known phenomena. First, anticancer drugs

including CPT can perturb the orderly progress of DNA replication fork and thus slowed S phase and cell division. Top 1 inhibition by CPT generates DNA double-strand breaks upon collision of a replication fork with a top 1 cleavable complex. DNA elongation inhibition is one of the most explored processes to be implicated in the cytotoxic mechanism of action of top 1 inhibitors (1, 28). Inhibition of DNA synthesis is observed in CPT-treated cells in the presence or absence of zVAD-fmk (Fig. 3a). Persistent inhibition of DNA replication in cells where caspases and apoptosis are inhibited could explain the observed slow passage through S/G<sub>2</sub> and it is consistent with accumulation of these cells at the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. Anticancer drugs can activate also cell cycle checkpoints that are key cell cycle events that tightly control transition of cells from one phase of the cell cycle to the next one. Expression of functional tumor suppressor gene p53 participates actively in the G<sub>1</sub> checkpoint in response to DNA damage. Nevertheless, several studies revealed that p53 -/- cells can undergo through a G<sub>1</sub> checkpoint also. However, some cancer cells, including U-937 cells, lacking functional p53 because of gene deletion or mutation and targeted disruption by the used of viral proteins, show hypersensitivity to DNA damaging agents like CPT (9, 29-31). Thus, to investigate further the molecular determinants underlying the observed accumulation of CPT-treated cells at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> when caspase activities are inhibited, we monitored the expression and activity of the cell cycle components of the G<sub>1</sub> checkpoint. Expression study of the specific cyclin-dependent kinases and cyclins involved during G<sub>1</sub> phase and G<sub>1</sub>/S transition of the cell cycle, reveals no major changes in expression of cdk2, cdk4, cdk6, cyclin D1 and cyclin E in CPT-treated U-937 cells in the absence or presence of

zVAD-fmk (Fig. 3b). Expression of cdk2 and cyclin E, the most important protein complex regulating G<sub>1</sub>/S transition, remains unchanged whether cells rapidly undergo apoptosis (CPT alone) or accumulate in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle (CPT in presence of zVAD-fmk). While cyclin D1 expression remains stable, cdk4 expression falls and cdk6 expression increases in the presence of zVAD-fmk 16 h after CPT treatment. Such changes do not explain the accumulation of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase that occurs between 4 h and 16 h after CPT treatment. Similarly, we detected no increased expression level of a variety of cyclin-dependent kinase inhibitors including p16, p21, p27 and p57 following CPT treatment in presence of zVAD-fmk (data not shown). To validate these expression studies, kinetics of cdk2, cdk4 and cdk6 kinase activities were monitored from CPT-treated cells in the absence or presence of zVAD-fmk, where cells undergo apoptosis or accumulate in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle, respectively. As shown in Fig. 4, cotreatment of cells with or without zVAD-fmk did not significantly modulate the kinase activities of cdk2, cdk4 and cdk6 following CPT treatment. Mitotic catastrophe associated with aberrant transient activation of cdc2/cdk1 has been suggested to contribute in apoptosis induced by several stimuli including top 1 and top 2 inhibitors (32-35) while other studies have indicated that several agents including top 2 inhibitors induce apoptosis in a context of reduced expression of cdc2/cdk1 in temperature-sensitive mutants (36). In U-937 cells treated with CPT either in the presence or absence of the caspase inhibitor zVAD-fmk, unscheduled activation or reduction in cdc2/cdk1 activity was not observed (Fig 4). Together, these results suggest that the observed accumulation of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> does not implicate a classical driven G<sub>1</sub> checkpoint when caspase inhibition is



enforced following CPT treatment. Moreover, slow passage through S/G<sub>2</sub> and accumulation of these cells at G<sub>1</sub> is associated more likely with the reported effects of CPT in mediating inhibition of DNA elongation following stabilization of top 1-linked DNA strand breaks and in preventing events into G<sub>1</sub> phase leading to replication complex initiation and stabilization involving top 1. Interaction of ongoing RNA transcription with top 1 cleavable complexes may generate also cytotoxic lesions that result in transient cell cycle arrest (1, 23, 28, 37). The importance of caspase activation during apoptosis has become eminently apparent in the last few years. However, enforced caspase inhibition following CPT treatment does not confer a survival advantage but shifts cell from apoptosis to massive necrotic cell death. Similar observations were reported previously in B lymphocytes treated with dexamethasone, where caspase inhibitors induced a switch from apoptosis to necrosis (27). Similarly, inducers of mitochondrial permeability transition have been shown to trigger caspase activation and apoptosis in thymocytes. Blocking caspase activities in these cells provoked a switch from apoptosis to necrosis (26). Finally, several studies have suggested that manipulation of cell cycle components can induce or inhibit apoptosis. However, no single ckd complex involved in G<sub>1</sub> checkpoint has been associated with a common pathway of apoptosis (38). Our observations in this study do not suggest a positive or negative role for the cell cycle components of the G<sub>1</sub> checkpoint in apoptosis or necrosis. These results do not necessarily rule out the implication of these proteins in other instances of induced cell death.

**ACKNOWLEDGEMENT**

This work was supported by the Medical Research Council of Canada (MT-15019). RB obtained scholarship from the Medical Research Council of Canada and the Research Cancer Society Inc. ATS was supported by studentships obtained from the Faculté des Etudes Supérieures (Université de Montréal). The authors wish to thank Myriam Beauchemin for technical assistance.

**REFERENCES**

1. Gupta, M., Fujimori, A., and Pommier, Y., Eukaryotic DNA topoisomerase I, *Biochim Biophys Acta*, *1262*, 1-14, 1995.
2. Pommier, Y., DNA Topoisomerase II Inhibitors, *in*: Teicher, B. A., Ed., *Cancer Therapeutics: Experimental and Clinical Agents*, pp. 153-174, Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 1997.
3. Kaufmann, S. H., Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note, *Cancer Res*, *49*, 5870-5878, 1989.
4. Barry, M. A., Behnke, C. A., and Eastman, A., Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia, *Biochem Pharmacol*, *40*, 2353-2362, 1990.
5. Bertrand, R., Sarang, M., Jenkin, J., Kerrigan, D., and Pommier, Y., Differential induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor cell lines with amplified c-myc expression, *Cancer Res*, *51*, 6280-6285, 1991.
6. Del Bino, G., and Darzynkiewicz, Z., Camptothecin, Teniposide, or 4'-(9-acridinylamino)-3-methanesulfon-m-anisidide, but not mitoxantrone or doxorubicin, induces degradation of nuclear DNA in the S-phase HL-60 cells, *Cancer Res*, *51*, 1165-1169, 1991.
7. Walker, P. R., Smith, C., Youdale, T., Leblanc, J., Whitfield, J. F., and Sikorska, M., Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes, *Cancer Res*, *51*, 1078-1085, 1991.

8. Hickman, J. A., Apoptosis induced by anticancer drugs, *Cancer Metast Rev*, *11*, 121-39, 1992.
9. O'Connor, P. M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T. G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D. A., Monks, A., Sausville, E. A., Weinstein, J. N., Friend, S., Fornace, A. J., and Kohn, K. W., Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents, *Cancer Res*, *57*, 4285-4300, 1997.
10. Dubrez, L., Savoy, I., Hamman, A., and Solary, E., Pivotal role of a DEVD-sensitive step in etoposide-induced and Fas-mediated apoptotic pathways, *EMBO J*, *15*, 5504-5512, 1996.
11. Martins, L. M., Kottke, T., Mesner, P. W., Basi, G. S., Sinha, S., Frigon, N., Tatar, E., Tung, J. S., Bryant, K., Takahashi, A., Svingen, P. A., Madden, B. J., McCormick, D. J., Earnshaw, W. C., and Kaufmann, S. H., Activation of multiple Interleukin-1-beta converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis, *J Biol Chem*, *272*, 7421-7430, 1997.
12. Sané, A. T., and Bertrand, R., Distinct steps in DNA fragmentation pathway during camptothecin-induced apoptosis involved caspase-, benzyloxycarbonyl- and N-tosyl-L-phenylalanylchloromethyl ketone-sensitive activities, *Cancer Res*, *58*, 3066-3072, 1998.
13. Alnemri, E. S., Mammalian cell death oroteases - a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases, *J Cell Biochem*, *64*, 33-42, 1997.

14. Cryns, V., and Yuan, J. Y., Proteases to die for, *Genes Devel*, *12*, 1551-1570, 1998.
15. Schmitt, E., Sane, A. T., and Bertrand, R., Activation and role of caspases in chemotherapy-induced apoptosis, *Drug Resist Updates*, *2*, 21-29, 1999.
16. Kuida, K., Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M. S. S., Rakic, P., and Flavell, R. A., Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9, *Cell*, *94*, 325-337, 1998.
17. Yoshida, H., Kong, Y. Y., Yoshida, R., Elia, A. J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J. M., and Mak, T. W., Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development, *Cell*, *94*, 739-750, 1998.
18. Liu, X. S., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. D., DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis, *Cell*, *89*, 175-184, 1997.
19. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S., A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature*, *391*, 43-50, 1998.
20. Halenbeck, R., Macdonald, H., Roulston, A., Chen, T. T., Conroy, L., and Williams, L. T., CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45, *Current Biol*, *8*, 537-540, 1998.
21. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, *26*, 239-257, 1972.

22. Schmitt, E., Cimoli, G., Steyeart, A., and Bertrand, R., Bcl-xL modulates apoptosis induced by anticancer drugs and delays DEVDase and DNA fragmentation-promoting activities, *Exp Cell Res*, *240*, 107-121, 1998.
23. Bertrand, R., O'Connor, P., Kerrigan, D., and Pommier, Y., Sequential administration of camptothecin and etoposide circumvents the antagonistic cytotoxicity of simultaneous drug administration in slowly growing human carcinoma, HT-29 cells, *Eur J Cancer*, *28A*, 743-748, 1992.
24. Thornberry, N. A., Ranon, T. A., Pieterse, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T., and Nicholson, D. W., A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B - Functional, relationships established for key mediators of apoptosis, *J Biol Chem*, *272*, 17907-17911, 1997.
25. Bicknell, G. R., and Cohen, G. M., Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis, *Biochem Biophys Res Comm*, *207*, 40-7, 1995.
26. Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M., and Kroemer, G., The apoptosis-necrosis paradox - Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death, *Oncogene*, *15*, 1573-1581, 1997.

27. Lemaire, C., Andreau, K., Souvannavong, V., and Adam, A., Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis, *FEBS Lett*, *425*, 266-270, 1998.
28. Kaufmann, S. H., Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs- more questions than answers, *Biochim Biophys Acta*, *1400*, 195-211, 1998.
29. Thomas, A., Elrouby, S., Reed, J. C., Krajewski, S., Silber, R., Potmesil, M., and Newcomb, E. W., Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia - Relationship between p53 gene mutation and Bcl-2/Bax proteins in drug resistance, *Oncogene*, *12*, 1055-1062, 1996.
30. Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B., Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21, *Nature*, *381*, 713-716, 1996.
31. Gupta, M., Fan, S. J., Zhan, Q. M., Kohn, K. W., Oconnor, P. M., and Pommier, Y., Inactivation of p53 increases the cytotoxicity of camptothecin in human colon HCT116 and breast MCF-7 cancer cells, *Clin Cancer Res*, *3*, 1653-1660, 1997.
32. Shi, L., Nishioka, W. K., Th'ng, J., Bradbury, E. M., Litchfield, D. W., and Greenberg, A. H., Premature p34cdc2 activation required for apoptosis, *Science*, *263*, 1143-5, 1994.
33. Pandey, S., and Wang, E., Cells en route to apoptosis are characterized by the upregulation of c-fos, c-myc, c-jun, cdc2, and RB phosphorylation, resembling events of early cell-cycle traverse, *J Cell Biochem*, *58*, 135-50, 1995.

34. Shimizu, T., O'Connor, P. M., Kohn, K. W., and Pommier, Y., Unscheduled activation of cyclin B1/Cdc2 kinase in human promyelocytic leukemia cell line HL60 cells undergoing apoptosis induced by DNA damage, *Cancer Res*, 55, 228-31, 1995.
35. Yao, S. L., McKenna, K. A., Sharkis, S. J., and Bedi, A., Requirement of p34(cdc2) kinase for apoptosis mediated by the Fas/Apo-1 receptor and interleukin 1-beta-converting enzyme-related proteases, *Cancer Res*, 56, 4551-4555, 1996.
36. Martin, S. J., McGahon, A. J., Nishioka, W. K., LaFace, D., Guo, X., Th'ng, J., Bradbury, E. M., and Green, D. R., p34cdc2 and apoptosis, *Science*, 269, 106-7, 1995.
37. O'Connor, P. M., Nieves-Neira, W., Kerrigan, D., Bertrand, R., Goldman, J., Kohn, K. W., and Pommier, Y., S-Phase population analysis does not correlate with the cytotoxicity of camptothecin and 10,11-methylenedioxcamptothecin in human colon carcinoma HT-29 cells, *Cancer Commun*, 3, 233-240, 1991.
38. Kastan, M. M., and Giordano, A., pRB and the CDKs in apoptosis and the cell cycle, *Cell Death Differentiation*, 5, 132-140, 1998.



**FIGURE LEGENDS**

- Fig. 1**      **The effects of caspase inhibition in CPT-treated U-937 cells.**
- Panels A)* Cell cycle progression after CPT treatment in the absence (*left panel*) and presence of zVAD-fmk (*right panel*). At the indicated times after CPT treatment (*x axis; h*), cells were processed for flow cytometry analysis. *Symbols*, sub-G0/G1 (*circles*), G0/G1 (*inverse triangles*), S (*squares*), G2/M (*triangles*). *Data points*, mean of two independent experiments (less than 10% difference between experiments).
- Panels B)* Caspase activities after CPT treatment in the absence (*left panel*) and presence of zVAD-fmk (*right panel*). At the indicated times after CPT treatment (*x axis; h*), DEVD-AMC hydrolysis was measured by fluorospectrometry. Enzyme activities were measured as initial velocities and expressed as relative intensity/min/mg. *Data points*, means of three independent determinations; *bars*, SE.
- Panels C)* DNA fragmentation pattern after CPT treatment in the absence (*left panels*) and presence of zVAD-fmk (*right panel*). DNA fragmentation was analyzed by standard agarose gel electrophoresis (*lanes 1, 2, 5, 6*) and TAFE (*lanes 3, 4, 7, 8*). Following electrophoresis, DNA was visualized by ethidium bromide staining. *Lane 1 and 3*, control U-937 cells; *lane 2 and 4*, 4 h following CPT treatment; *lane 5 and 7*, 24 h following

CPT treatment + zVAD-fmk; *lane 6 and 8*, 48 h following CPT treatment + zVAD-fmk.

**Fig.2**      **The effects of caspase inhibition on cellular morphology in CPT-treated U-937 cells.** Electron micrographs of control and CPT-treated U-937 cells in the absence or presence of zVAD-fmk. Cells were collected and processed for electron microscopy at the indicated times after drug treatment.

**Fig.3**      **The effects of zVAD-fmk on expression of cell cycle-related proteins in CPT-treated U-937 cells.**

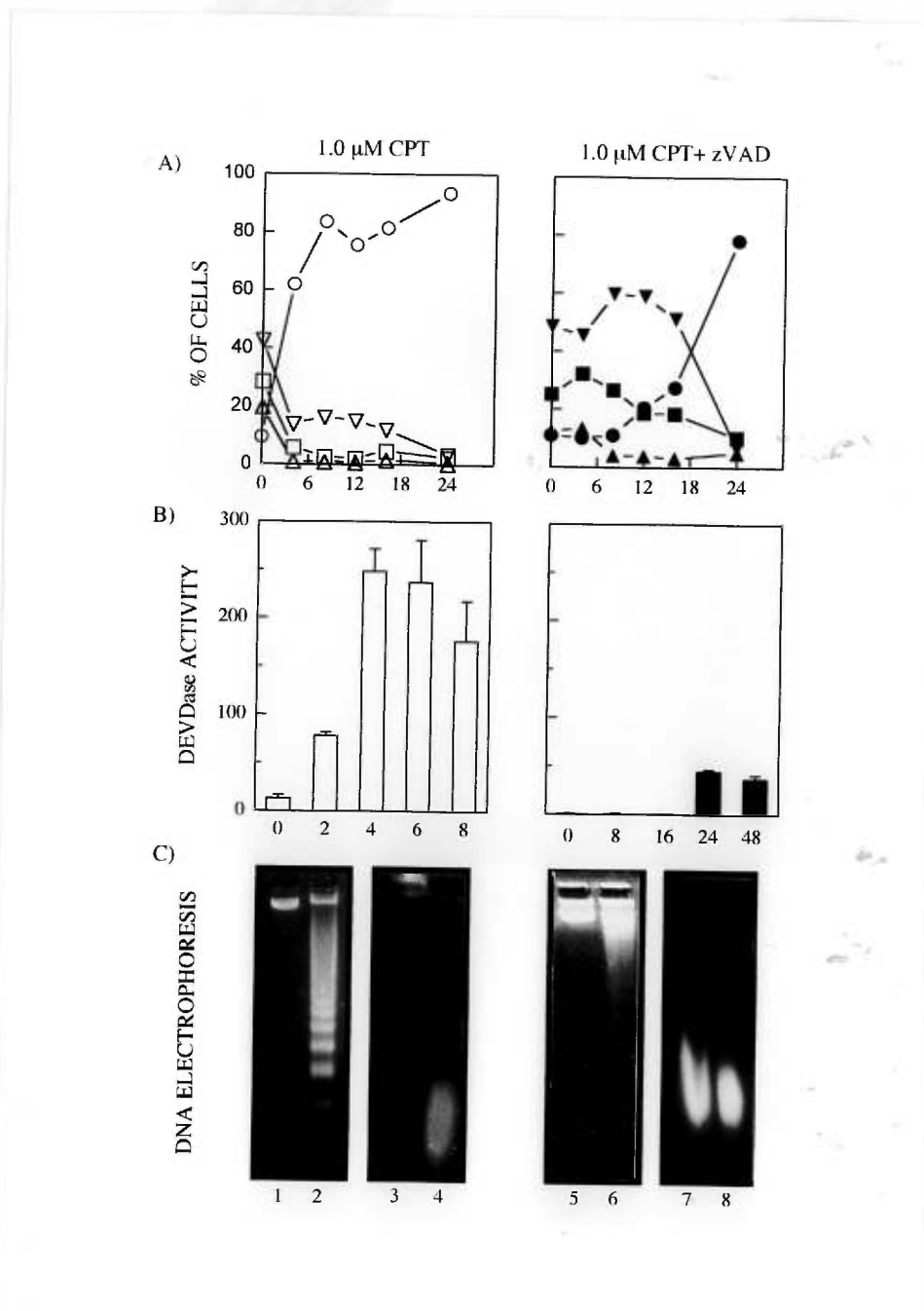
*Panel A)* Kinetics of DNA synthesis following drug treatment in U-937 cells. At the indicated times after drug treatment (*x axis; h*), [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation was determined by 10-min pulse experiments. Values are expressed as rate of DNA synthesis relative to control untreated cells. *Symbols* , CPT treatment (open circles), zVAD-fmk treatment (closed circles), CPT + zVAD-fmk treatment (closed squares). *Data points*, means of four independent determinations; *Bars*, SE.

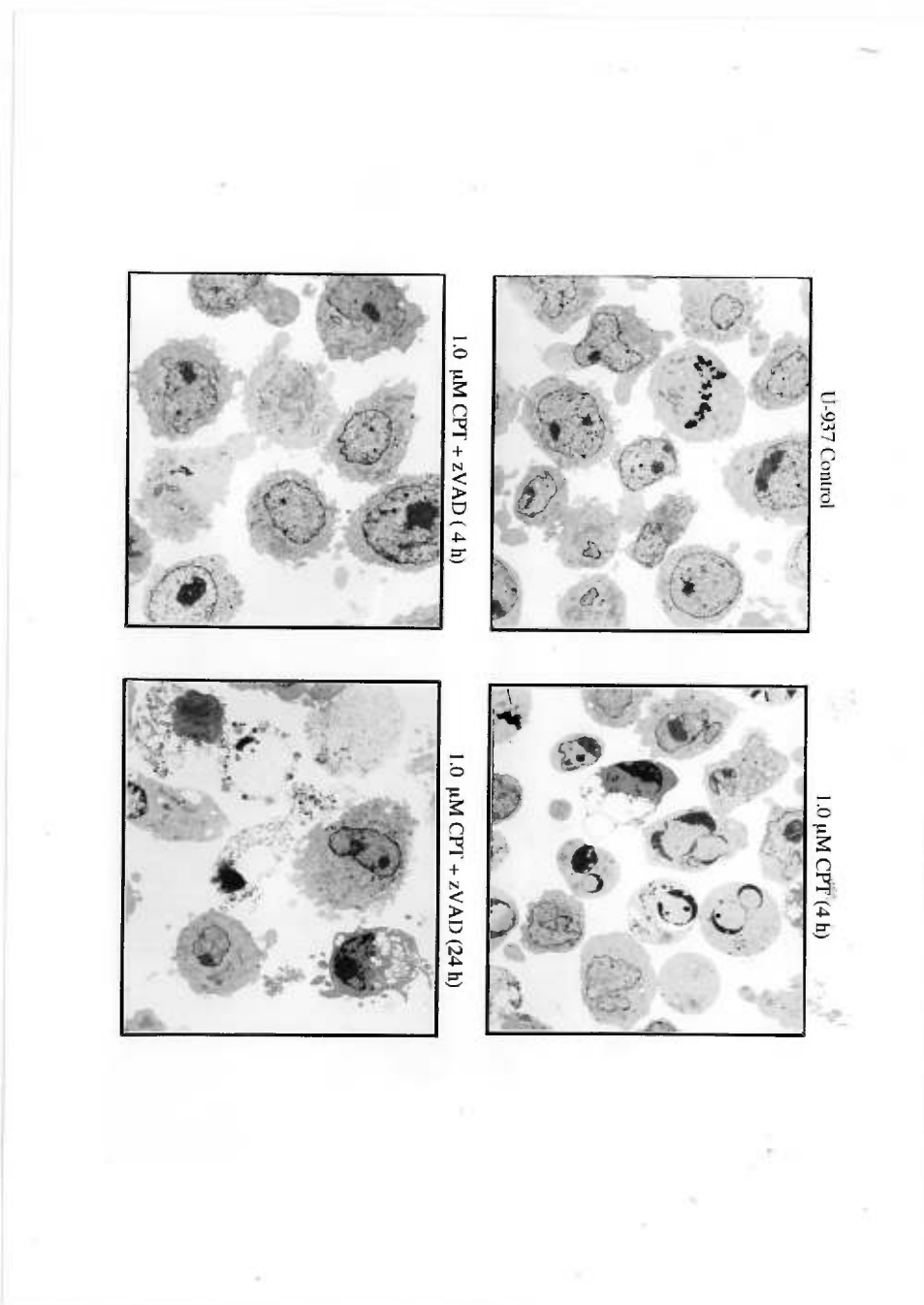
*Panels B)* Kinetics of cdk and cyclin expression after CPT treatment in the absence or presence of zVAD-fmk . Whole-cell extracts were prepared as described under Materials and Methods from U-937 cells. Cdk and cyclin proteins were detected using specific antibodies after SDS-PAGE and transfer

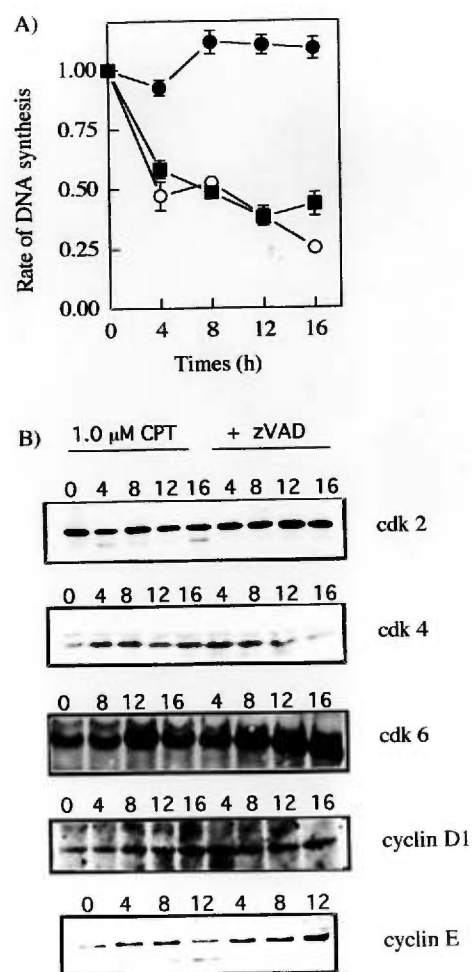
to Immobilon-P membrane. *Numbers above lanes*, hours after drug treatment.

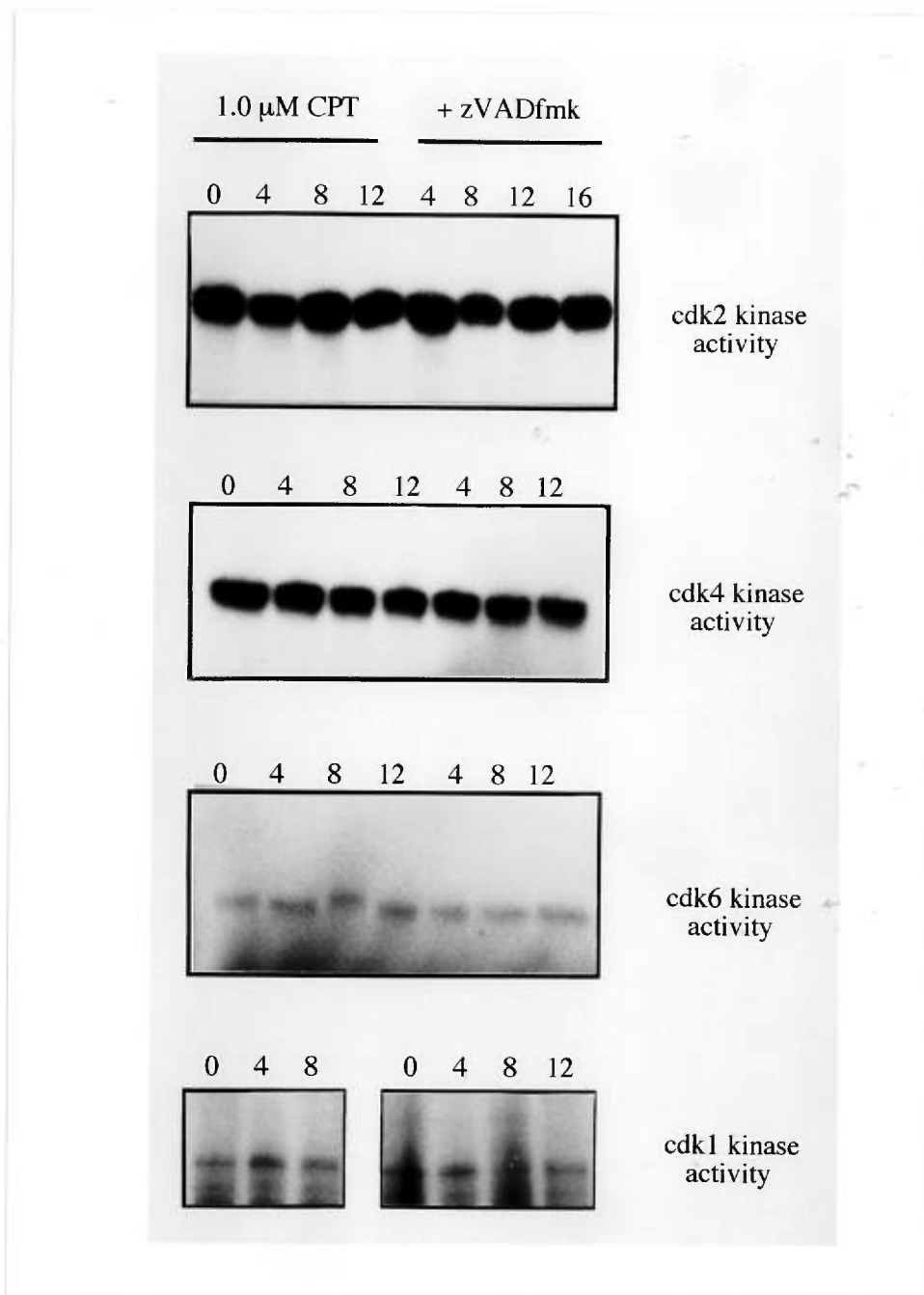
**Fig.4** **Kinetics of cyclin dependent kinase activities in CPT-treated U-937 cells in the absence or presence of zVAD-fmk.** Immuno complexes were obtained using specific antibodies and incubated in kinase buffer in presence of [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP. The phosphorylated substrate was resolved by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. *Numbers above lanes*, hours after drug treatment.

Figure 1 : Sané et al.



**Figure 2** : Sané et al.

**Figure 3** : Sané et al.

**Figure 4** : Sané et al.

### CHAPITRE 3 - DISCUSSION

En oncologie, l'intérêt porté à l'apoptose vient des observations selon lesquelles la malignité de certaines tumeurs cancéreuses était associée à l'incapacité des cellules à s'engager dans une apoptose spontanée (Baserga, 1994; Reed, 1994; Korsmeyer, 1995). Dans la thérapie du cancer, l'intérêt grandissant pour l'apoptose est né des observations indiquant que les radiations ionisantes et les drogues anticancéreuses sont souvent capables d'induire ce type de mort cellulaire (Reed, 1995; Hickman, 1996). L'efficacité de plusieurs drogues anticancéreuses est liée à leur capacité à induire l'apoptose chez plusieurs lignées cellulaires dérivées de cancers humains (Reed, 1995; Hickman, 1996). Un contrôle altéré de l'apoptose chez les tumeurs traitées pourrait définir un nouveau type de mécanisme de résistance aux drogues anticancéreuses (Reed, 1995; Hickman, 1996). L'étude des mécanismes par lesquels des agents particuliers induisent la réponse apoptotique chez les cellules tumorales est devenue l'objet de recherches intensives. La dégradation de la chromatine en fragments d'ADN de haut poids moléculaire et en ceux de petit poids moléculaire est un processus conservé durant l'apoptose (Barry *et al.*, 1990; Bertrand *et al.*, 1991b; 1993; Bruno *et al.*, 1992; Del Bino & Darzynkiewicz, 1991; Jaxel *et al.*, 1988; Kaufmann, 1989; Solary *et al.*, 1993a; Walker *et al.*, 1991; Weaver *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1996). Même si la digestion complète de l'ADN n'est pas essentielle à la mort d'une cellule, elle est sûrement



un processus capital pour faciliter la phagocytose des corps apoptotiques par les cellules environnantes. La dégradation de l'ADN évite ainsi la transformation, l'infection et la recombinaison inappropriée de l'ADN des cellules en apoptose dans les cellules phagocytantes. Cette digestion complète de l'ADN est d'autant plus importante pour les cellules saines environnantes que les cellules apoptotiques sont malignes ou infectées par des virus (Berke, 1994; Savill, 1992; 1998; Savill *et al.*, 1989; 1993; Savill & Haslett, 1995). Par ailleurs, une littérature abondante suggère que les cellules malignes ont développé des mécanismes de résistance à l'apoptose. Ces mécanismes semblent impliquer aussi bien l'expression que la régulation de protéines anti-apoptotiques de la famille des Ced-9/BCL et des IAP qui inhibent l'activité des caspases (Dole *et al.*, 1995; Ibrado *et al.*, 1996a; Simonian *et al.*, 1997; Schmitt *et al.*, 1998a,b; Susin *et al.*, 1998). En comprenant davantage les mécanismes impliqués dans l'activation de l'apoptose induite par les drogues anticancéreuses, la possibilité de moduler ces processus pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies d'amélioration de la chimiothérapie des cancers.

Les drogues anticancéreuses utilisées en clinique, comme les inhibiteurs des topoisomérases d'ADN de type 1 et 2, sont capables de déclencher la mort cellulaire dans une variété de lignées cellulaires en induisant rapidement les changements morphologiques, la fragmentation de haut poids moléculaire et oligonucléosomique de l'ADN, caractéristiques de l'apoptose. Les mécanismes

impliqués dans les fragmentations de haut poids moléculaire et oligonucléosomique de l'ADN ne sont pas bien définis, mais plusieurs observations, incluant les nôtres, indiquent que la fragmentation de haut poids moléculaire et l'extensive fragmentation oligonucléosomique de l'ADN sont induites par deux mécanismes distincts dans les cellules traitées avec la CPT (Bruno *et al.*, 1992; Dubrez *et al.*, 1996; Ghibelli *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1996; Chap.2, Sané & Bertrand, 1998; Shimizu & Pommier, 1996; Solary *et al.*, 1996; Weaver *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1996).

### **3. 1 Mode d'action et cytotoxicité de la camptothécine**

Les recherches sur la topoisomérase I d'ADN comme cible importante de la chimiothérapie se sont intensifiées depuis qu'on a découvert que la CPT est un puissant inhibiteur de cet enzyme. La top 1 catalyse la réaction de relaxation de l'ADN superenroulé et elle joue un rôle important dans la réplication et la transcription de l'ADN, et possiblement dans les réarrangements génétiques (Champoux, 1990; Wang, 1991). La réaction de relaxation se fait en créant des brisures simple-brin dans l'ADN (Wang, 1991). En présence de la top 1, la CPT stabilise les brisures simple-brin causées par la top1. L'enzyme se lie de façon covalente à l'extrémité 3' de l'ADN, par une réaction de transestérification entre le groupement hydroxyl de la tyrosine catalytique (Tyr 723) et le lien phosphodiester du phosphate à l'extrémité 3' de l'ADN (Hsiang *et al.*, 1988).

Ce type de lésion à l'ADN est connu sous le nom de complexe de clivage (Hsiang *et al.*, 1985) stabilisé par la CPT (Pommier *et al.*, 1994; Pommier & Tanizawa, 1993). Les études menées sur les levures mutantes pour la top1 démontrent que la cytotoxicité de la CPT est attribuée à son action sur la top 1 (Bjornsti *et al.*, 1989; Nitiss & Wang, 1988) et la formation des complexes de clivage est responsable de l'activité antitumorale de la CPT plus que l'inhibition de la top 1 (Pommier *et al.*, 1994; Pommier & Tanizawa, 1993).

La CPT stabilise les complexes de clivage top 1-ADN pendant tout le cycle cellulaire, mais ces complexes de clivage sont principalement létaux dans les cellules en phase S du cycle cellulaire lors de la réplication de l'ADN (Horwitz & Horwitz, 1973). La stabilisation des complexes de clivage est essentielle pour promouvoir la mort cellulaire mais ces lésions sont rapidement réparées à l'intérieur d'une cellule. Cependant, une fraction de ces complexes de clivage peut être convertie en lésions irréversibles lorsque les fourches de réplication en progression entrent en collision avec eux (Ryan *et al.*, 1991). Les lésions résultantes sont complexes et peuvent générer des brisures double-brin (Svejstrup *et al.*, 1991). La perception des dommages à l'ADN entraîne une série de réponses cellulaires associées aux voies de signalisation du stress, à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'activation des caspases qui catalysent la cascade biochimique des réactions connues sous le nom d'apoptose.

L'investigation de l'effet de la CPT sur la fragmentation de l'ADN a permis de montrer que les fragments de masse moléculaire élevée étaient prédominamment autour de 45-50 kpb chez les cellules traitées bien que des fragments de plus haut poids moléculaire (> 600 à 700 kpb) étaient observées aux premières heures suivant le traitement à la CPT (Chap.2; Sané & Bertrand, 1998). L'apparition transitoire des bandes d'ADN > 600 kpb a été rapportée comme coïncidant avec la formation des complexes topoisomérase-ADN induits par les inhibiteurs de topoisomérases et réversibles après retrait de la CPT (Beere *et al.*, 1995; Beere *et al.*, 1996; Rusnak *et al.*, 1996). Ces fragments de haut poids moléculaire > 600 kpb ne sont pas impliqués dans la phase initiale de fragmentation de l'ADN pendant l'apoptose, mais sont des dommages spécifiques provenant des inhibiteurs de topoisomérases et qui produisent les signaux d'initiation de l'apoptose (Beere *et al.*, 1995; 1996; Rusnak *et al.*, 1996). Bien que le clivage de l'ADN en fragments de haut et de faible poids moléculaire soit devenu une caractéristique principale de la mort apoptotique, les mécanismes moléculaires de la désintégration nucléaire ne sont pas encore totalement compris. On peut suggérer, cependant, que les cellules maintiennent deux pools séparés d'activités endonucléolytiques responsables de la fragmentation de haut et de faible poids moléculaire de l'ADN et, selon le type cellulaire, un ou deux pools enzymatiques seront activés durant l'apoptose (Pandey *et al.*, 1994; Walker & Sikorska, 1994; Walker *et al.*, 1994).

### **3.2 Effets du CrmA, de la TPCK et de la zVAD-fmk dans les fragmentations oligonucléosomique et de haut poids moléculaire induites par la CPT**

La fragmentation de l'ADN, dans les cellules apoptotiques, est de deux ordres. Le clivage commence aux points d'attachement des domaines d'ADN à la matrice nucléaire pour générer des fragments de haut poids moléculaire d'environ 200-300 et 50 kpb (Walker & Sokorska, 1994). L'ADN est ensuite clivé en fragments oligo- et mononucléosomiques qu'on peut visualiser sur un gel standard d'agarose (Wyllie, 1980). Le traitement des cellules U-937 à la CPT induit ces deux ordres de fragmentation de l'ADN (Chap.2, Sané *et al*, 1997; Sané & Bertrand, 1998; 1999).

La cinétique de la fragmentation de haut poids moléculaire a démontré une prédominance des fragments de 45-50 kpb (Chap.2, Sané & Bertrand, 1998). Les fragments supérieurs à 600 kpb, qui sont également observés, ne sont probablement pas impliqués dans la phase initiale de la fragmentation de l'ADN durant l'apoptose, mais résultent de la formation du complexe ADN-protéine stabilisée par la CPT qui va, finalement, induire l'initiation de l'apoptose (Beere *et al*, 1995; Rusnak *et al*, 1996). Même à de fortes concentrations, la TPCK n'inhibe pas la fragmentation de haut poids moléculaire induite par la CPT. Au contraire, la zVAD-fmk abolit complètement cette fragmentation et celle de petit poids moléculaire (Chap.2; Sané & Bertrand, 1998). L'observation que le

CrmA et la TPCK inhibent la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN dans les lignées cancéreuses Namalwa et U-937 après le traitement avec la CPT sans interférer avec l'activation des caspases et la fragmentation de haut poids moléculaire indique que les voies CrmA- et TPCK-sensibles sont impliquées dans la fragmentation oligonucléosomique (Chap.2; Sané & Bertrand, 1998; Chap.2; Sané *et al.*, 1997). Nos résultats suggèrent, aussi, que les voies des caspases protéolytiques sont associées aux voies qui induisent la fragmentation de haut poids moléculaire, alors que d'autres voies sont associées à la fragmentation oligonucléosomique (Chap.2; Sané & Bertrand, 1998). De plus, la fragmentation de haut poids moléculaire semble être une étape obligatoire à la fragmentation oligonucléosomique qui est dépendante des activités TPCK-sensibles. Bien qu'il soit connu que le CrmA soit un puissant inhibiteur des caspase-1 et -8, il a été démontré qu'il n'inhibe pas *in vivo* les caspase-3 et -6 principalement impliquées dans l'apoptose induite par les inhibiteurs des topoisomérases (Zhou *et al.*, 1997). Malgré le rôle important des sérine protéases dans l'apoptose, peu d'études ont identifié des enzymes putatifs. L'inhibition de la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN par la TPCK pourrait être liée à sa capacité d'inhiber la sérine protéase AP24, capable d'initier ce type de fragmentation de l'ADN (Wright *et al.*, 1994; 1998). Les protéases sensibles à l'effet de la TPCK, et qui sont activées dans les premières phases de l'apoptose induite par la CPT, n'ont pas encore été identifiées. Cependant, des sérines protéases actives qui induisent la fragmentation

oligonucléosomique de l'ADN dans un système acellulaire ont été détectées dans des extraits cytosoliques provenant de cellules traitées avec les inhibiteurs de topoisomérases. À partir de ces études, il a été suggéré que des sérines protéases activaient une voie impliquée dans la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN (Ghibelli *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1996; Shimizu & Pommier, 1996; Solary *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 1996). Il a été également rapporté que la voie sensible à la DCI pouvait aussi conduire à la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN dans les cellules traitées avec VP16 (Dubrez *et al.*, 1996) alors que les activités de type trypsine semblaient activer l'apoptose suite au traitement des cellules avec la CPT (Adjei *et al.*, 1996).

Dans le système acellulaire reconstitué, les extraits cytosoliques des cellules traitées à la CPT induisent la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN des noyaux purifiés, mais ces extraits ne digèrent pas l'ADN plasmidique (résultats non publiés), suggérant la nécessité de facteurs nucléaires pour induire la fragmentation. La TPCK abolit la fragmentation oligonucléosomique, mais l'Ac-DEVD-CHO ne l'affecte pas dans le système acellulaire reconstitué (Chap.2; Sané & Bertrand, 1998). Ces résultats suggèrent que l'inhibition des activités DEVDases contenues dans ce système ne suffit pas à abolir la fragmentation de l'ADN. Ces observations suggèrent que d'autres activités promotrices de la fragmentation de l'ADN sont déjà présentes dans les extraits cytosoliques et qu'elles ne sont pas inhibées par l'Ac-DEVD-CHO. Cependant, dans les mêmes conditions, le zVAD-COOH abolit la fragmentation

oligonucléosomique. De façon intéressante, nous avons observé que les dérivés benzyloxycarbonylés réduisent considérablement la fragmentation oligonucléosomique (Chap.2; Sané & Bertrand, 1998). Ces observations montrent que le groupement benzyloxycarbonyl inhibe la fragmentation oligonucléosomique sans affecter l'activité DEVDase. De plus, la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN, observée durant l'apoptose, implique des activités TPCK- et benzyloxycarbonyl-sensibles qui agissent en aval de l'activité DEVDase.

### **3.3 Activation des protéases durant l'apoptose**

Beaucoup de caspases sont impliquées durant le processus apoptotique et leurs activités sont associées à la mort cellulaire elle-même (Kerr *et al.*, 1972; 1995; Wyllie, 1984; 1997). Morphologiquement, ce processus est caractérisé par une perte du volume cellulaire, une compacité de l'hétérochromatine périphérique suivie du clivage du noyau et du cytoplasme pour former des corps apoptotiques (Martins *et al.*, 1997b). Plusieurs études ont montré que caspase-3 joue un rôle critique dans l'apoptose induite par les agents qui causent des dommages à l'ADN, en l'occurrence la CPT (Datta *et al.*, 1996; Dubrez *et al.*, 1996; Martins *et al.*, 1997a; Macfarlan *et al.*, 1997; Shimizu & Pommier, 1997) et son activation coïncide avec l'induction de l'apoptose dans les cellules U-937 (Chap.2; Sané *et al.*, 1997). Cependant, il n'y a pas d'augmentation de l'activité



caspase-1 ( Chap.2; Sané *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent que les caspase-1 et -8 ne sont pas impliquées dans l'apoptose induite par la CPT.

Les changements biochimiques qui accompagnent le processus d'activation des caspases sont le relâchement du cytochrome c de l'espace mitochondrial intermembranaire dans le cytosol (Martins *et al.*, 1997b; Yang *et al.*, 1997), l'activation de la caspase-3 et d'autres caspases effectrices (Datta *et al.*, 1996; Faleiro *et al.*, 1997; Ibrado *et al.*, 1996b; Martins *et al.*, 1997a), le clivage sélectif de plusieurs polypeptides intracellulaires (Villa *et al.*, 1997), le clivage de l'ADN en fragments de haut (Walker *et al.*, 1991) et de petit (Kaufmann, 1989) poids moléculaire et la perte de l'intégrité membranaire.

Les caspases activées lors de l'apoptose sont des enzymes constitutifs synthétisés sous la forme de proenzymes qui doivent subir une protéolyse pour libérer les sous-unités actives (Thornberry *et al.*, 1997; Villa *et al.*, 1997; Whyte, 1996). Des études biochimiques ont identifié trois polypeptides requis pour l'activation de la procaspase-3 *in vitro*. Un de ces polypeptides est l'Apaf-1 qui est une protéine d'ancrage du cytochrome c et de la caspase-3 (Zou *et al.*, 1997); le deuxième est la procaspase-9 (Li *et al.*, 1997) et le troisième est le cytochrome c (Liu *et al.*, 1996). L'analyse des interactions de ces trois composés (Li *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997) suggère que la liaison du cytochrome c à l'Apaf-1 en présence de la dATP amène des modifications qui permettent à celui-ci de lier et d'activer la procaspase-9 (Li *et al.*, 1997). Même

si le mécanisme d'activation de la procaspase-9 reste à définir, les observations précédentes selon lesquelles la procaspase-1 et la procaspase-8 pouvaient s'autoactiver (Muzio *et al.*, 1998) soulèvent la possibilité que l'activation protéolytique de la procaspase-9 par le complexe cytochrome c/Apaf-1 soit autocatalytique. En effet, la délétion des répétitions WD-40 de l'Apaf-1 rend celui-ci constitutivement actif et capable d'activer la procaspase-9 indépendamment du cytochrome c et de la dATP. L'Apaf-1 forme des oligomères qui facilitent l'autoactivation de la procaspase-9 par l'oligomérisation de ses molécules précurseurs (Srinivasula *et al.*, 1998).

La participation du cytochrome c à l'activation des caspases est bien démontrée. Le traitement des cellules intactes avec de l'étoposide induit le relâchement du cytochrome c des mitochondries dans le cytoplasme avant ou en même temps que survient l'activation de la caspase-9 et de la caspase-3 (Kharbanda *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 1997b; Yang *et al.*, 1997). De plus, on a montré que les polypeptides qui retardent l'apoptose, tels BCL-2 et BCL-xL, retardent aussi le relâchement du cytochrome c et l'activation subséquente de la caspase-3 (Hu *et al.*, 1998b; Kharbanda *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Kluck *et al.*, 1997a,b ; Martins *et al.*, 1997b; Yang *et al.*, 1997).

Les souris Apaf1<sup>-/-</sup> démontrent une apoptose réduite dans les cellules du cerveau et des anomalies crano-faciales frappantes avec une hyperprolifération des cellules neuronales. Les cellules qui n'expriment pas l'Apaf-1 sont résistantes à une variété de stimuli apoptotiques tels l'anisomycine, le cisplatine, l'étoposide

ou les radiations ultraviolettes et l'activation protéolytique des caspase-2, -3 et -8 est bloquée (Cecconi *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998b). Cependant, les thymocytes et les lymphocytes T activés Apaf1<sup>-/-</sup> sont sensibles à l'apoptose induite par Fas (Yoshida *et al.*, 1998b), suggérant que celle-ci est indépendante de l'Apaf-1. De plus, la translocation du cytochrome c des mitochondries au cytoplasme n'est pas bloquée dans les fibroblastes embryonnaires Apaf1<sup>-/-</sup> traités avec l'étoposide, la staurosporine ou les radiations ultraviolettes (Yoshida *et al.*, 1998b). L'Apaf-1 agit donc en aval du relâchement du cytochrome c et joue un rôle clé dans la plupart des voies de l'apoptose dépendante des mitochondries. Ce rôle est critique lors du développement normal (Cecconi *et al.*, 1998).

Par ailleurs, dans les thymocytes et les hépatocytes caspase-3<sup>-/-</sup> induits à entrer en apoptose le par FasL, la fragmentation de l'ADN est retardée. De plus, le clivage de substrats variés des caspases tels la gelsoline, la fodrine, la lamine B et le Dff45/Icad est retardé ou totalement absent (Zheng *et al.*, 1998). Le clivage altéré de ces substrats semble donc être responsable de l'apoptose aberrante observée dans ces cellules.

La majorité des souris où la caspase-9 a été délétée meurent à la période périnatale avec un cerveau démesurément gros et malformé (Hakem *et al.*, 1998; Kuida *et al.*, 1998). La délétion de la caspase-9 empêche l'activation de la caspase-3 dans les cerveaux embryonnaires et les thymocytes qui n'expriment pas la caspase-9 sont résistants à une variété de stimuli apoptotiques avec comme conséquence l'absence de clivage de la caspase-3 et une fragmentation retardée de l'ADN (Hakem *et al.*, 1998; Kuida *et al.*, 1998). Les cellules

souches embryonnaires caspase-9<sup>-/-</sup> demeurent résistantes à l'apoptose induite par les UV et les radiations  $\gamma$ ; cependant, les thymocytes caspase-9<sup>-/-</sup>, bien qu'ils soient résistants à la dexaméthasone et aux radiations  $\gamma$ , sont sensibles à l'apoptose induite par les UV et par l'anti-CD95 (Hakem *et al.*, 1998). De plus, malgré leur résistance à l'apoptose, le cytochrome c continue à être transloqué dans le cytosol des cellules souches embryonnaires caspase-9<sup>-/-</sup> traitées avec les radiations UV (Hakem *et al.*, 1998). Toutes ces observations suggèrent une exigence variable de la caspase-9 sous différents stimuli apoptotiques et son rôle critique comme activateur situé en amont de la cascade protéolytique des caspases.

L'ablation de la caspase-8 est létale *in utero* chez les souris. Chez les embryons mutants pour la caspase-8 le développement du coeur est compromis et les érythrocytes s'accumulent en amas (Varfolomeev *et al.*, 1998). De plus, les fibroblastes dérivés de ces embryons résistent à l'apoptose induite par le TNFR, Fas et DR3 (Varfolomeev *et al.*, 1998). Ces données suggèrent que la caspase-8 joue un rôle nécessaire et non redondant par rapport à la caspase-3, par exemple, dans l'apoptose induite par plusieurs récepteurs de la famille du TNF/NGF et joue également un rôle vital lors du développement embryonnaire. Chez les souris mutantes pour la caspase-2 les cellules germinales sont ancrées dans les ovaires et les oocytes sont résistants à l'apoptose induites par la doxorubicine. De plus, l'apoptose induite par la granzyme B et les perforines est altérée dans les lymphocytes B déficients pour la caspase-2. Cependant, la mort cellulaire des neurones moteurs est accélérée durant le développement des souris mutantes pour la caspase-2 et les neurones sympathiques dépourvus de la caspase-2 meurent plus rapidement d'apoptose que les neurones de type

sauvage après privation de NGF (Bergeron *et al.*, 1998). Il ressort de ses observations que la caspase-2 agit à la fois positivement et négativement sur la mort cellulaire, dépendant de la lignée cellulaire et du stade de développement. Beaucoup de questions sur l'activation des caspases restent à élucider. Étant donné que l'activation des précurseurs des caspases implique un clivage protéolytique à l'extrémité carboxylique des résidus aspartiques, on devrait s'attendre à ce que tous les précurseurs de caspases préexistants soient activés simultanément lors de l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques. Le traitement des lignées cellulaires leucémiques aboutit à l'activation des caspase-9, -3, -6 et -7 (Datta *et al.*, 1996; Eischen *et al.*, 1997; Faleiro *et al.*, 1997; Ibrado *et al.*, 1996b; Martins *et al.*, 1997a,b; Yang *et al.*, 1997) et parfois à celle des caspase-8 et -2 (Droin *et al.*, 1998; Dubrez *et al.*, 1996; Eischen *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 1997a,b; Yang *et al.*, 1997). Cette activation sélective de certains précurseurs de caspases soulève davantage de questions sur le contrôle de l'activation des caspases. De plus, il n'est pas clair si les caspases effectrices comme les caspase-3, -6 et -7 agissent en parallèle (Hirata *et al.*, 1998; Lazebnik *et al.*, 1995) ou séquentiellement (Orth *et al.*, 1996). Récemment, le niveau de phosphorylation des caspases a été décrit comme un autre facteur déterminant de leur activité (Cardone *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 1998). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour évaluer plus précisément l'importance de ces modifications post-traductionnelles en cours d'apoptose induite par les agents anticancéreux. Les sérines protéases jouent

également un rôle important dans l'apoptose induite par les inhibiteurs de topoisomérases (Bruno *et al.*, 1992; Ghibelli *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1996; Shimizu *et al.*, 1996; Solary *et al.*, 1996; Weaver *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1996). Cette observation est d'autant plus vraie que chez les cellules Hep 3B du carcinome hépatocellulaire, l'apoptose induite par la CPT n'implique pas la cascade protéolytique des caspases manifestée dans le clivage de la PARP et de la lamine B. Au contraire, une activité trypsine semble activer l'apoptose dans ces cellules (Adjei *et al.*, 1996).

La sérine protéase bien connue, la granzyme B, est capable d'activer une cascade protéolytique qui implique les caspases, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, dans le cas de l'apoptose médiée par les lymphocytes T cytotoxiques dans les cellules cibles (Berke, 1995; Darmon *et al.*, 1995; 1996; Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Greenberg, 1996). La granzyme B est une sérine protéase qui clive ses substrats, spécifiquement, après les résidus aspartiques. En plus de cliver la caspase-3, la granzyme B peut également cliver les caspase-7, -8, et -10 (Chinnaiyan *et al.*, 1996; Darmon *et al.*, 1995; 1996; Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1996; Vincenz & Dixit, 1997).

L'implication des sérines protéases dans l'apoptose est davantage supportée par l'observation que les inhibiteurs de ces protéases (e.g. DCI, TPCK) empêchent la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN induite par la CPT dans les cellules U-937 (Komatsu *et al.*, 1998; Chap.2: Sané & Bertrand, 1998; 1999;

Chap.2: Sané *et al.*, 1997; Weaver *et al.*, 1993). Comme la TPCK, le CrmA inhibe la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN induite par la CPT sans interférer avec l'activation des caspases impliquées dans l'apoptose induite par la chimiothérapie (Chap.2; Sané *et al.*, 1997). De ce point de vue, on a décrit récemment une serpine intracellulaire humaine qui ressemble au CrmA, la PI-9, qui inhibe efficacement la granzyme B *in vitro* et est fortement exprimée par les lymphocytes cytotoxiques. La PI-9 protège les cellules transfectées contre l'apoptose induite par granzyme B et non contre celle induite par le Fas (Bird *et al.*, 1998). Il semble donc que la PI-9 protège les lymphocytes cytotoxiques contre une mort prématurée qui serait causée par une mauvaise compartimentalisation de la granzyme B, mais n'interfère pas avec l'éradication des cellules du système immunitaire induite par le Fas. D'autres études ont également suggéré la participation des protéases de type cathepsine dans l'apoptose (Deiss *et al.*, 1996; Hetman *et al.*, 1995; Moallem & Hales, 1995; Shibata *et al.*, 1998; Zhou & Salvesen, 1997).

### **3. 4 Cascades protéolytiques en aval des caspases**

Une fois les caspases activées, une série de clivages protéolytiques s'opèrent en aval. Les substrats connus des caspases peuvent être groupés en trois catégories: d'abord, les protéines de structure du cytosquelette et de la matrice nucléaire (e.g. fodrine, actine et lamines) dont l'intégrité structurelle est rompue

suite au clivage par les caspases (Kaufmann, 1989; Lazebnik *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 1996); ensuite, les enzymes dont l'activité est augmentée (e.g. Gas2, gelsoline, protéine kinase C $\delta$  et C $\theta$ ) après qu'ils aient été clivés par les caspases (Brancolini *et al.*, 1995; Datta *et al.*, 1997; Kothakota *et al.*, 1997) et, enfin, les enzymes dont l'activité est inhibée (e.g. PARP et DNA-PK) suite au clivage par les caspases (Casciola-Rosen *et al.*, 1995; Fernandes-Alnemri *et al.*, 1995b; Kaufmann, 1989; Kaufmann *et al.*, 1993; Lazebnik *et al.*, 1994b; Song *et al.*, 1996).

Parmi les enzymes inactivés par les caspases on peut citer la PARP et la sous-unité catalytique de la DNA-PK, deux enzymes activés par les brisures à l'ADN et qui sont impliqués dans leur réparation (Nicholson & Thornberry, 1997; Villa *et al.*, 1997). Ces deux enzymes sont clivés au site DEVD↓G par la caspase-3 et possiblement par la caspase-7 (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1995b; Lazebnik *et al.*, 1994a; Song *et al.*, 1996), résultant en des fragments incapables de participer à la réparation de l'ADN (Kaufmann *et al.*, 1993; Song *et al.*, 1996). On sait aussi que la top 1 (Casciola-Rosen *et al.*, 1995; Kaufmann, 1989; Voelkel-Johnson *et al.*, 1995) et la top 2 (Kaufmann, 1989; Su *et al.*, 1995) clivées lors de l'apoptose induite par la chimiothérapie mais il reste à déterminer si ces clivages sont médiés par les caspases.

Les Cdks associées à la cycline A semblent, aussi, être activées par les caspases, bien que les substrats des caspases, dans ce cas, soient les Cdkis, p21 et p27 plutôt que les kinases elles-mêmes (Levkau *et al.*, 1998). Dans les cas où



l'on a montré que les kinases étaient directement clivées par les caspases, l'expression des ADNc codant pour les protéines tronquées correspondantes provoquent l'apoptose (Datta *et al.*, 1997; Ghayur *et al.*, 1996; Lahti *et al.*, 1995). Bien que ces résultats suggèrent que les produits de clivage par les caspases puissent activement participer aux événements subséquents de l'apoptose comme médiateurs, il faudrait voir si l'apoptose observée ne reflète pas simplement un effet toxique de la surexpression d'une kinase quelconque dans des conditions incontrôlées. De plus, il reste à déterminer si ces clivages particuliers sont une caractéristique constante de l'apoptose ou sont uniques à certaines lignées cellulaires et/ou à certains stimuli apoptotiques. Il faudrait également évaluer les effets du clivage par les caspases sur les spécificités de substrats de ces kinases.

### **3.5 Effet de l'inhibition des protéases sur l'apoptose et le cycle cellulaire**

Les cellules des mammifères possèdent des mécanismes complexes de régulation de la progression du cycle cellulaire, et les points de contrôle du cycle cellulaire sont des événements-clés dans la transition d'une phase à une autre (Kaufmann & Paules, 1996). Les points de contrôle de la phase  $G_1$  sont activés par les dommages à l'ADN et sa réplication incomplète pour empêcher les cellules d'entrer en phase S. L'inhibition persistante de la réplication de l'ADN, dans les cellules où les caspases et l'apoptose sont inhibées, peut

expliquer le passage lent à travers la phase S/G<sub>2</sub> et est conforme avec l'accumulation des cellules U-937 en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

L'inhibition des activités caspases par la zVAD-fmk abolit l'apoptose et provoque une accumulation transitoire des cellules U-937 en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> du cycle cellulaire (Chap.2; Sané & Bertrand, 1998; 1999). Dans les résultats du chap.2 (Sané & Bertrand, 1998) nous avons montré que la TPCK n'empêche pas les cellules U-937 traitées à la CPT de mourir, alors que l'addition de la zVAD-fmk permet le maintien d'une perméabilité membranaire substantielle et d'une activité métabolique du MTT dans ces cellules. Ces observations suggèrent que la zVAD-fmk, qui inhibe l'activation des caspases et la fragmentation de haut poids moléculaire, protège, momentanément, ces cellules de la mort cellulaire induite par la CPT. De plus, la TPCK, contrairement à la zVAD-fmk, n'inhibe pas les changements morphologiques typiques de l'apoptose (Chap.2; Sané & Bertrand, 1998; 1999). Comparées aux résultats obtenus sur l'analyse de la fragmentation de l'ADN, ces observations suggèrent que les changements morphologiques observées, lors de l'apoptose induite par la CPT, sont indépendants de la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN et coïncident avec l'apparition de l'activité DEVDase et de la fragmentation de haut poids moléculaire. L'analyse en flux cytométrique nous a permis d'observer que l'addition de la TPCK aux cellules traitées avec la CPT réduisait substantiellement les niveaux d'ADN sous-diploïde (Chap.2; Sané & Bertrand, 1998). Ce constat reflète l'effet inhibiteur de la TPCK sur la fragmentation

oligonucléosomique. Par contre, l'addition de la zVAD-fmk a maintenu de bas niveaux de population de cellules à ADN sous-diploïde. De plus, le passage des cellules en phase  $G_2$  est ralenti, ce qui confirme la réversibilité de l'inhibition par la CPT, de la synthèse et de la réplication de l'ADN (Gupta *et al.*, 1995; O'Connor *et al.*, 1997). Par ailleurs, ces cellules s'accumulent à la phase  $G_0/G_1$ . Ces résultats suggèrent que l'inhibition des caspases, dans ces cellules, restaure ou démasque le point de contrôle de la phase  $G_1$  du cycle cellulaire après traitement avec la CPT. Cependant, cette accumulation en  $G_0/G_1$  n'implique pas un contrôle classique en  $G_1$  quand l'inhibition des caspases est prolongée, mais elle est vraisemblablement associée aux effets de la CPT qui médie l'inhibition de l'élongation de l'ADN par la stabilisation des complexes de clivage. En effet, ni l'expression des Cdks et des cyclines, ni celle des Cdkis ne sont modulées pendant l'arrêt transitoire en  $G_0/G_1$ . De plus, il n'y a pas de modulation des activités kinases de cdk2, cdk4 et cdk6 sous l'effet de la zVAD-fmk (Chap.2; Sané & Bertrand, 1999). Beaucoup d'études ont suggéré que la manipulation des constituants du cycle cellulaire pouvait induire ou inhiber l'apoptose. Cependant, aucun complexe Cdk impliqué dans la phase  $G_1$  n'a été associé à la voie apoptotique habituelle (Kasten & Giordano, 1998). Nos observations ne suggèrent aucun rôle particulier des constituants de la phase  $G_1$  dans l'apoptose ou la nécrose. Cependant, ces constituants pourraient être impliqués dans d'autres cas de mort cellulaire induite.

Dans les cellules qui contiennent des copies fonctionnelles de p53, le traitement à la CPT induit parfois l'arrêt en  $G_1$  pour permettre les réparations de l'ADN. L'arrêt en  $G_1$  est le résultat d'une modification post-traductionnelle qui accroît la demi-vie de la p53 et permet son accumulation (Fritsche *et al.*, 1993; Nelson & Kastan, 1994). La p53 agit à son tour comme activateur transcriptionnel de la p21 qui inhibe les Cdks responsables de la progression des cellules de la phase  $G_1$  à la phase S (Leonard *et al.*, 1995). Cependant, dans d'autres cas, à faible concentration, la CPT induit un arrêt à mi-chemin de la phase S, alors qu'aux concentrations plus élevées la CPT provoque un arrêt en  $G_2/M$  (Slichenmyer *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 1996; Waldman *et al.*, 1996). D'autre part, dans plusieurs lignées cellulaires, la CPT active rapidement l'apoptose sans passer par les points de contrôle du cycle cellulaire (Bertrand *et al.*, 1991a,b; 1992; 1993; 1995; Bertrand & Pommier, 1995; O'Connor *et al.*, 1990; 1991; Chap.2, Sané & Bertrand, 1998; Schmitt *et al.*, 1998a,b; Solary *et al.*, 1993b; 1994; 1996).

Les deux mécanismes par lesquels les cellules meurent sont l'apoptose, pendant laquelle les cellules effectrices induisent une cascade autolytique et la fragmentation de l'ADN dans les cellules cibles avant la lyse cellulaire, et la nécrose pendant laquelle des molécules lytiques, comme la perforine, sont secrétées par les cellules effectrices dans l'espace intercellulaire où elles polymérisent pour former des pores dans les membranes des cellules cibles et

conduire ainsi à la lyse cellulaire (Berke, 1994; 1995). Les deux mécanismes impliquent vraisemblablement l'expression des caspases, mais la décision finale est liée à la capacité des caspases à exercer leur activité. Ainsi l'inhibition prolongée des caspases activées lors de l'apoptose induit la mort cellulaire par nécrose (Hirsch *et al.*, 1997; Leist *et al.*, 1997; Lemaire *et al.*, 1998; Lemasters *et al.*, 1998; Chap.2, Sané & Bertrand, 1999; Zamzami *et al.*, 1997).

### **3.6 Activation des endonucléases et fragmentation de l'ADN**

Nous avons montré qu'il y a deux étapes dans la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose induite par la CPT et que ces étapes peuvent être séparées expérimentalement en utilisant des inhibiteurs spécifiques de protéases (Chap.2; Sané & Bertrand, 1998). Nos résultats, dans les cellules en culture et dans le système acellulaire, montrent que, en aval de l'activité DEVDase et de la fragmentation de haut poids moléculaire, les activités TPCK- et benzyloxycarbonyl-sensibles sont impliquées dans la fragmentation oligonucléosomique. Dans les cellules U-937 traitées avec la CPT, l'inhibition de l'activité caspase par la zVAD-fmk abolit les changements morphologiques et la fragmentation de l'ADN typiques de l'apoptose. Cependant, dans notre système acellulaire contenant des extraits cytosoliques actifs, bien que l'Ac-DEVD-CHO et le zVAD-COOH inhibent l'activité caspase, leurs effets sur la fragmentation de l'ADN sont totalement différents. L'Ac-DEVD-CHO était

incapable d'inhiber la fragmentation de l'ADN, alors que le zVAD-COOH et les autres dérivés du benzyloxycarbonyl abolissent la fragmentation oligonucléosomique. Ces observations suggèrent que, en plus de son effet sur l'activité caspase, la zVAD-fmk doit inhiber d'autres activités benzyloxycarbonyl-sensibles impliquées dans la fragmentation *in vivo* de l'ADN. Les cibles cellulaires de la TPCK et du benzyloxycarbonyl dans les extraits cytosoliques actifs ne sont pas encore identifiées, mais pourraient faire partie du système Dff-/Cad (Liu *et al.*, 1997; Sakahira *et al.*, 1998; Enari *et al.*, 1998; Halenbeck *et al.*, 1998; Inohara *et al.*, 1999). Il est connu, maintenant, que la transfection des cellules avec l'ADNc codant pour une forme mutée non clivable du Dff45/Icad inhibe la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN mais n'empêche pas les changements morphologiques liés à l'apoptose (Sakahira *et al.*, 1998). Non seulement ces observations confirment que l'apoptose peut survenir sans fragmentation internucléosomique de l'ADN (Oberhammer *et al.*, 1993a; Chap.2, Sané & Bertrand, 1998; Ucker *et al.*, 1992), mais elles indiquent aussi que des activités insensibles au Dff45/Icad sont impliquées dans les changements morphologiques qui accompagnent l'apoptose. De plus, l'identification du complexe Dff45/Icad-Dff40/Cpan/Cad pourrait expliquer l'habileté de certains inhibiteurs de protéases à inhiber la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN. L'activité promotrice de la fragmentation de l'ADN est complètement abolie dans les extraits cellulaires des tissus mutants pour le Dff45/Icad (Zhang *et al.*, 1998). En réponse à des

stimuli apoptotiques (e.g. actinomycine D, étoposide et staurosporine), les splénocytes, les thymocytes et les granulocytes des souris mutantes pour le Dff45/Icad sont résistants à la fragmentation de l'ADN, et les splénocytes et les thymocytes sont aussi résistants à la condensation de la chromatine. Cependant, le développement du système immunitaire de ces souris mutantes demeure normal (Zhang *et al.*, 1998). Ces observations suggèrent que le Dff45/Icad joue un rôle critique dans l'induction de la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine *in vivo*, mais qu'il n'est pas requis pour le développement normal du système immunitaire. Plusieurs groupes ont démontré que la TLCK et/ou la TPCK inhibent l'apoptose induite par la CPT et la téniposide dans les thymocytes de rats (Bruno *et al.*, 1992; Kaufmann *et al.*, 1993; Shimizu & Pommier, 1997; Weaver *et al.*, 1993). D'autres expériences ont indiqué que les caspases, ainsi que d'autres cystéines protéases (Kaufmann *et al.*, 1993), sont inhibées par les chlorométhylcétone (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1995b). Les observations faites maintenant sur le clivage du Dff45/Icad par la caspase-3 et sur l'activation du Dff40/Cpan/Cad (Sakahira *et al.*, 1998) permettent de suggérer que l'étape TPCK-sensible impliquée dans la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN est potentiellement associée aux activités du Dff40/Cpan/Cad.

La protéase de 24 kDa, qui a été purifiée des cellules U937 induites en apoptose par TNF $\alpha$ , les radiations UV, la CPT, l'étoposide et le chlorambucil, est capable d'activer la fragmentation internucléosomique de l'ADN dans des noyaux

purifiés (Wright *et al.*, 1994; 1998). Cette fragmentation oligonucléosomique de l'ADN est inhibée par la TPCK et non par la TLCK (Wright *et al.*, 1994). Étant donné que la TPCK est un inhibiteur bien connu des sérine protéases de la famille des chymotrypsines, on peut avancer l'hypothèse que l'activité d'une sérine protéase est essentielle pour au moins une voie apoptotique, opérant dans différents types cellulaires, en réponse à différents stimuli. Une fois activée, la protéase de 24 kDa agirait sur un substrat, une endonucléase présumément, qui demeure normalement latente dans le noyau. Il n'est pas exclu que cette protéase clive d'autres molécules telle la PARP pour libérer des fragments enzymatiquement actifs (Kaufmann *et al.*, 1993) qui vont à leur tour activer des nucléases endogènes.

Malgré l'intérêt qui a été porté au complexe Dff45/Icad-Dff40/Cpan/Cad, il est important de noter que la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN n'est pas le seul type de dégradation de l'ADN rencontré dans les cellules apoptotiques. Les brisures simple-brin de l'ADN (Tomei *et al.*, 1993) et les brisures double-brin moins fréquentes qui résultent dans la fragmentation de haut poids moléculaire (Oberhammer *et al.*, 1993a; Walker *et al.*, 1991), ont été également décrites. Beaucoup d'études, incluant la nôtre, suggèrent que la fragmentation de haut poids moléculaire survient avant la fragmentation oligonucléosomique (Cohen *et al.*, 1994; Oberhammer *et al.*, 1993a; Chap.2, Sané & Bertrand, 1998). Même si on a soulevé la possibilité que les fragments



de hauts poids moléculaires soient générés par l'action de la top 2, de récentes études utilisant l'inhibiteur catalytique, l'ICRF-193, de la top 2 plaident contre cette hypothèse. En effet, cet agent qui bloque la stabilisation des complexes de clivage top 2-ADN, est incapable de bloquer la formation des fragments de haut poids moléculaire dans les cellules induites à entrer en apoptose par la N-méthylformamide (Beere *et al.*, 1996). Il apparaît, pour ainsi dire, qu'il existe une endonucléase, plutôt que la top 2, qui est responsable de la genèse des fragments de haut poids moléculaire observés dans les cellules apoptotiques. Les études menées avec les inhibiteurs des caspases suggèrent que l'activation de cette endonucléase requiert une activité caspase (Chap.2, Sané & Bertrand, 1998; 1999; Zhu *et al.*, 1995). De plus, l'inhibition de cette activité caspase par la zVAD-fmk inhibe la fragmentation de haut poids moléculaire et les changements morphologiques liés à l'apoptose (Chap.2, Sané & Bertrand, 1998). Cependant, une inhibition prolongée de l'activité caspase n'accorde pas un surcroît de survie aux cellules, mais oriente les cellules vers une mort par nécrose (Chap.2, Sané & Bertrand, 1999). Récemment, on a montré que l'AIF induit la condensation de la chromatine et la fragmentation de haut poids moléculaire de l'ADN dans des noyaux purifiés (Susin *et al.*, 1999b; 1997 ). L'AIF semble être une protéase ou un activateur de protéase qui active certaines caspases comme la caspase-9 et la caspase-3 et est inhibé par la z-VAD-fmk (Cai *et al.*, 1998; Decaudin *et al.*, 1998; Marzo *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 1998 ; Susin *et al.*, 1999b; 1997). L'AIF pourrait donc être associé à l'activité

promotrice de la fragmentation de haut poids moléculaire de l'ADN. Il reste à déterminer, cependant, si l'AIF possède des similitudes avec les caspases connues. Même si cette endonucléase n'a pas encore été identifiée, le fait que la fragmentation de haut poids moléculaire peut survenir sans la fragmentation oligonucléosomique (Oberhammer *et al.*, 1993b; Chap.2, Sané & Bertrand, 1998; 1999) suggère que ces deux types de fragmentations sont induits par des endonucléases différentes (Walker & Sikorska, 1994; Walker *et al.*, 1994). L'identification de l'AIF comme facteur induisant la fragmentation de haut poids moléculaire sans être inhibé par la z-VAD-fmk suggère l'existence d'une voie apoptotique caspase-indépendante dans l'induction de l'apoptose nucléaire (Susin *et al.*, 1999b).

Bien que le consensus ne soit pas encore atteint on peut citer, parmi les endonucléases impliquées dans la fragmentation extensive de l'ADN durant l'apoptose, la L-DNase II (Torriglia *et al.*, 1998), la DNase II (Krieser & Eastman, 1998), l'AN34 (Yoshida *et al.*, 1998a) et l'endonucléase de 97 kDa (Pandey *et al.*, 1997).

La L-DNase II induit le clivage oligonucléosomique de l'ADN et les changements morphologiques observés durant l'apoptose (Torriglia *et al.*, 1998).

Le fait que cette endonucléase dérive du LEI "*leukocyte elastase inhibitor*" élargit la participation des serpins comme CrmA dans l'apoptose.

La transfection des cellules CHO avec la DNase II induit la condensation de la chromatine et la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN. Cependant, cette

condensation de la chromatine n' est pas inhibée par la z-VAD-fmk (Krieser & Eastman, 1998). Il apparaît donc que la DNase II est directement responsable de la condensation de la chromatine dans le processus apoptotique.

L'AN34 purifiée des cellules HL-60 traitées avec l'étoposide induit la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN dans les noyaux purifiés et sur l'ADN linéaire du virus SV40 (Yoshida *et al.*, 1998a). L'activité de l'AN34 est indétectable dans les cellules non traitées et la z-VAD-fmk inhibe son activité dans les cellules traitées (Yoshida *et al.*, 1998a). Ces observations suggèrent, en conséquence, que l'AN34 est activée par les caspases durant l'apoptose chez les cellules HL-60. Par ailleurs, comme le Dff40/Cpan/Cad, l'AN34 est activée en présence de  $Mg^{2+}$  sans  $Ca^{2+}$  (Enari *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998a). Des investigations supplémentaires méritent d'être faites pour établir la relation qui pourrait exister entre le Dff40/Cpan/Cad et l'AN34.

L'endonucléase de 97 kDa est dépendante du  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  et induit la fragmentation internucléosomique de l'ADN dans les noyaux purifiés (Pandey *et al.*, 1997). Cette endonucléase est spécifiquement responsable de la fragmentation de petit poids moléculaire puisque, quand elle est retranchée, il reste encore une autre activité nucléolytique responsable de la fragmentation de haut poids moléculaire de l'ADN, qui est dépendante du  $Mg^{2+}$  et qui induit les changements nucléaires (Pandey *et al.*, 1997). Ces observations suggèrent fortement que les endonucléases responsables des deux types de fragmentations de l'ADN existent dans des pools physiquement séparés dans le noyau. Ainsi

l'activité responsable de la production des fragments de haut poids moléculaire paraît être liée à la chromatine dans les sites d'attache de la matrice nucléaire (Lagarkova *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1994) et l'activité responsable de la fragmentation de petit poids moléculaire de l'ADN doit avoir un libre accès aux sites internucléosomiques et, pour cela, doit être soit nucléoplasmique ou associée, de manière lâche, à la chromatine.

On a décrit récemment une activité z-VADase et une activité DNase relâchées par les mitochondries des cellules traitées avec l'Atr (atractyloside) (Susin *et al.*, 1999a). L'Atr est un ligand de l'ANT "*adenine nucleotide translocator*" et induit l'ouverture des pores mitochondriaux causant ainsi la rupture de membrane externe. L'activité z-VADase est nécessaire au relâchement et à la maturation de l'AIF et elle n'est pas affectée par l'immunodéplétion de cytochrome c. L'activité DNase n'est pas inhibée par l'ATA "*aurintricarboxylic acid*" qui inhibe le Dff40/Cpan/Cad (Susin *et al.*, 1999a), ce qui suggère que cette activité est différente du Dff40/Cpan/Cad. Ainsi il y a maintenant quatre constituants (le cytochrome c, l'activité zVADase, l'activité DNase et l'AIF) qui sont libérés par les mitochondries suite à certains stimuli apoptotiques.

### 3.7 Conclusions

L'apoptose induite par la CPT est liée à l'activation de caspases et de sérines protéases, et d' au moins deux pools d'endonucléases responsables de la fragmentation de haut poids et de petit poids moléculaire de l'ADN.

La fragmentation oligonucléosomique de l'ADN n' est pas une condition *sine qua non* à la mort cellulaire. Son inhibition par la TPCK ou la protéine CrmA n'empêche pas les changements morphologiques de survenir. Au contraire, la fragmentation de haut poids moléculaire est suffisante à induire la mort apoptotique.

Les caspases sont impliquées dans les changements morphologiques et l'activation de la fragmentation de haut poids moléculaire de l'ADN caractéristiques de l'apoptose.

La dégradation extensive de l'ADN en fragments internucléosomiques dépend d'activités endonucléolytiques liées à l'activation de sérines protéases et d'activités sensibles au benzyloxycarbonyl et à la protéine CrmA.

L'inhibition des activités caspases n'offre pas un surcroît de survie aux cellules apoptotiques mais les oriente plutôt vers une mort nécrotique après un transit en phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire suite à un traitement à la CPT.

Les voies d'initiation de l'apoptose et de la nécrose sont identiques mais différent dans la présence ou non de caspases actives.

Il n'y a pas de lien immédiat entre l'activation des caspases lors de l'apoptose induite par la CPT et les activités kinases dépendantes des cyclines.

### **3.8 Perspectives**

Nous avons démontré que les extraits cytosoliques des cellules traitées à la CPT contenaient des caspases et des facteurs qui induisent la fragmentation de l'ADN typique de l'apoptose lorsque ces extraits sont incubés avec des noyaux de cellules contrôles. Cependant, ces extraits ne digèrent pas l'ADN plasmidique, malgré la variété de conditions utilisées, suggérant que des interactions avec d'autres facteurs nucléaires sont nécessaires. Deux activités distinctes de promotion de la fragmentation de l'ADN sont présentes dans ces extraits et induisent la fragmentation de haut et de petit poids moléculaire. Le blocage *in vitro* des activités DEVDases avec de fortes concentrations d'Ac-DEVD-CHO n'atténue que légèrement la fragmentation de haut poids

moléculaire; cette observation indique que l'Ac-DEVD-CHO empêche l'accumulation de facteurs promoteurs de la fragmentation de l'ADN mais n'inhibe pas directement ceux qui ont été déjà activés dans les extraits obtenus des cellules traitées à la CPT. Cependant, l'addition de la TPCK et de benzyloxycarbonyl réduit de façon marquée la fragmentation oligonucléosomique mais n'atténue pas la fragmentation de haut poids moléculaire et les activités caspases dans le système acellulaire. Ces résultats suggèrent la présence d'activités TPCK- et benzyloxycarbonyl-sensibles impliquées dans la fragmentation internucléosomique de l'ADN. On ne sait pas encore si la TPCK et le benzyloxycarbonyl interfèrent avec des facteurs cytosoliques ou avec des facteurs nucléaires. On ne sait pas non plus si les activités TPCK- et benzyloxycarbonyl-sensibles font partie du système Dff40/Cpan/Cad, ou d'AIF, ou d'AP24 ou des autres nucléases isolées à ce jour. Pour répondre à ces interrogations il faut initier une purification de ces facteurs présents dans les extraits cytosoliques. L'obtention de protéines purifiées permettra de les caractériser davantage et d'identifier les facteurs nucléaires associés à la fragmentation de haut poids moléculaire et oligonucléosomique de l'ADN suite au traitement de cellules avec la CPT et, ultérieurement, avec d'autres agents anticancéreux.

## ANNEXE

**Activation and role of caspases in chemotherapy-induced apoptosis (Drug Resistance Updates 2 : 21-29, 1999)**

Estelle Schmitt , Alain-Théophile Sané and Richard Bertrand <sup>(1)</sup>  
Hospital Research Center of University of Montreal,  
Notre-Dame Hospital, Montreal Cancer Institute.

*Keywords: Apoptosis; Caspase; Bcl-like; Mitochondria; Cancer chemotherapy.*

(1) To whom correspondence should be addressed; Hospital Research Center of University of Montreal, Notre-Dame Hospital, 1560 Sherbrooke St. east, Room Y-5634, Montreal (Quebec) H2L 4M1 CANADA.

Phone: (514) 281 6000 ext 6615;

Fax: (514) 896 4689;

Email: bertranr@ere.umontreal.ca



# Activation and role of caspases in chemotherapy-induced apoptosis

Estelle Schmitt, Alain-Théophile Sané, Richard Bertrand

Hospital Research Center of University of Montreal, Notre-Dame Hospital, Montreal Cancer Institute, Canada

**Abstract** The importance of caspase activation during apoptosis has become eminently apparent in the last few years. The caspases participate in a proteolytic cascade activated in response to various stimuli, including anticancer drugs, that results in the systematic and orderly eradication of the cell. The core machinery of caspase activation is now emerging and involves multiple molecular complexes. We describe the two best-studied models of caspase activation, the mitochondrial pathway and the cell death receptor pathway, and discuss their involvement in caspase activation induced by various anticancer drugs used in chemotherapy. Defective apoptosis contributes to tumor growth and drug resistance. Understanding the activation and role of caspases in apoptosis may help develop new therapeutic strategies to circumvent drug resistance.

## INTRODUCTION

Apoptosis or programmed cell death is a natural process that plays a crucial role in development, regulation of cell homeostasis and elimination of abnormal and harmful cells.<sup>1</sup> Excessive or insufficient cell death contributes to human diseases including neurodegenerative disorders, autoimmune and neoplastic diseases.<sup>2</sup> Apoptosis contributes to tumor development since the rate of cell death as well as the rate of cellular proliferation are determining factors of tumor growth. In cancer therapy, the interest in apoptosis arises because of observations that ionizing radiation, antitumor drugs, cytokines and growth suppressor factors often trigger this mode of cell death. Moreover, the efficacy of several antitumor drugs correlates with their ability to induce apoptosis in human cancer cells and defective control of apoptosis in treated tumors constitutes a form of drug resistance mechanism.<sup>3</sup> Programmed cell death is characterized by an ordered sequence of morphological changes such as cytoplasmic shrinkage, membrane blebbing, chromatin condensation, nuclear breakdown and distinctive DNA fragmentation. Core components of the cell death machinery were defined recently by genetic studies of the nematode *Caenorhabditis elegans* where four key cell death genes, *ced-9*, *ced-4*, *ced-3* and *egl-1* have been identified.<sup>4-7</sup> Both *ced-4* and *ced-3* are essential for cell death to occur whereas *ced-9* antagonizes the function of *ced-4* and *ced-3* by protecting cells from death. *Egl-1* promotes cell death and negatively regulates the function of *ced-9*. Mammalian homologs of these genes have recently been identified. Ced-9 protein presents significant homologies to the mammalian Bcl-like family that contains combination of

Bcl-2 homology domains (BH1, BH2, BH3 or BH4 domain) and includes antiapoptotic Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, A-1/Bfl-1/Grb, Bcl-w, Brag-1 and proapoptotic Bax, Bak, Bcl-xS, Mtd/Bok/Bod members. Egl-1 contains only BH3 domain, similar to the mammalian cell death activators that includes Bik/Nbk (and its close murine homolog mBkl), Bid, Hrk, Bad, Bim and BNip3.<sup>8,9</sup> Ced-3 is related to the cysteine protease interleukin-1 $\beta$  converting enzyme (ICE), a member of a growing family of ICE-like proteases now called caspases, for cysteine aspartic acid-specific proteases.<sup>10-12</sup>

Recently, Apaf-1, the first human homolog of *ced-4* was identified (13). Functional analysis of *ced-9*, *ced-3* and *ced-4* proteins and their mammalian counterparts has given rise to a molecular framework for cell death in which the caspases play a central role.<sup>14-17</sup> After cell death initiation by diverse stimuli and insults like anticancer drugs, initiator caspases are activated and process other downstream members of the death protease family, resulting in sequential proteolytic events that converge to amplify the initial apoptotic signal. The activation of this proteolytic cascade ends with the cleavage of a variety of cytosolic, cytoskeletal, nuclear or other cellular proteins resulting in the systematic and orderly morphological changes of the cell undergoing apoptosis. In this review we report and discuss recent progress in the understanding of the molecular frameworks that regulate caspase activation in cells that initiate the apoptotic program. We describe the two best-studied models of caspase activation, the mitochondrial pathway and the CD95/Fas/APO-1 death receptor pathway, and discuss their involvement in caspase activation induced by various anticancer drugs used in chemotherapy.

## CASPASE ACTIVATION IN APOPTOSIS; GENERAL FEATURES

To date, more than 12 human caspases are identified. They are separated in three subfamilies based on their degree of homology and phylogenetic analysis: the ICE-related family includes ICE/caspase-1, TX/ICH-2/ICE<sub>rel</sub>-II/caspase-4, Ty/ICE<sub>rel</sub>-III/caspase-5, ERICE/caspase-13; the CED3/CPP32-related family includes CPP32/Yama/Apopain/caspase-3, Mch-2/caspase-6, Mch-3/ICE-LAP3/CMH-1/caspase-7, Mch5/Flice/Mach/caspase-8, Mch-4/Flice-2/caspase-10; and the third group includes ICH-1/caspase-2, ICE-LAP6/Mch6/caspase-9 and Viz/caspase-14. Two more murine caspases, mICH-3/caspase-11 and mICH-4/caspase-12, have been described with no known human counterparts identified yet.<sup>10-12</sup> Ectopic overexpression of many caspases results in apoptosis, and deficient mice for caspase -2, -3, -8 and -9, generated by homologous recombination, exhibit severe cell death abnormalities.<sup>18-22</sup> However, mice deficient for caspase -1 and -11, a close homolog of caspase-4, do not show altered cell death phenotype.<sup>23,24</sup> These data showed that some caspases, including caspase -1, -11 (and presumably -4 and -5), are unlikely to be involved directly in apoptosis and are believed to play a role in pro-cytokine activation. These observations also reveal that individual members of the caspase superfamily play non-redundant roles during development and perhaps in pathways of induced apoptosis. Mice deficient in various members of the Bcl-like family, such as

Bcl-2, Bcl-x, Bax and Bcl-w, and in Apaf-1 show similar non-redundant role for those proteins in regulating apoptosis.<sup>25-27</sup>

Caspases have a conserved peptapeptide sequence (QACXG) that contains the active cysteine residue. They are synthesized as inactive zymogens that require at least two sequential proteolytic cleavages at aspartic acid residue to generate the mature catalytically active heterodimers. Caspases have an autocatalytic activity when they are produced at very high concentration (by ectopic expression using eucaryotic or procaryotic expression vector systems), but their activation during apoptosis is sequential; some caspases process and activate others.<sup>10-12</sup> Two types of distinct conserved protein-protein interaction motifs, named death effector domain (DED) and caspase recruitment domain (CARD), are found at the amino-terminal prodomains of several caspases. These domains play a central role in the formation of caspase activating apparatus *in vivo*. DED are present on caspase -8 and -10 and on the death adapter protein FADD/MORT-1. CARD are present on caspase -1, -2, -4, -5, -9 and -13 and on the death adapter proteins RAIDD/CRADD and Apaf-1. In the mitochondrial pathway of caspase activation, Apaf-1 eases caspase-9 autoactivation by oligomerizing its precursor molecules via CARD domain interactions in presence of cytochrome c and dATP.<sup>15</sup> Similar models are proposed for caspase -2, -8 and -10 activation. Caspase -8 and -10 precursors present a very low level of intrinsic caspase activity but after being recruited to ligand-activated cell death receptors by FADD/MORT-1 via DED domain interactions, they reach a sufficient local concentration and presumably a configuration to be activated and initiate apoptosis triggered by activated CD95/APO-1/FasR, TNF-R1 and Dr3/TRAMP/WSL-1/LARD death receptors. Caspase-2 is targeted to activated TNF-R1 receptor via the death adapter protein RAIDD/CRADD at the RIP-TRADD-TNF-R1 complex through CARD-CARD interactions. Caspases such as caspase -2, -8, -9 and -10 that have long amino-terminus prodomains containing DED or CARD modules, act as initiator caspases while others such as caspase-3, -6 and -7 that contain short prodomains and no DED or CARD prodomains, act as effector caspases in the apoptotic process.<sup>11,12</sup>

Activation of caspases after death stimuli result in morphological cellular changes that culminate in disassembly of the dying cell and engulfment by neighboring cells. Although multiple protein substrates of caspases are identified, the functional significance of their proteolysis in cell death is often poorly understood. Cleavage site specificity of the caspases was outlined using a positional scanning peptide substrate combinatorial approach. Based on their individual specificity, caspases are divided into three groups; caspase -2, -3 and -7 have preference for DEXD motif, caspase -6, -8 and -9 present preference for (I/L/V)EXD, while caspase -1, -4 and -5 prefer (W/L)EHD sequence.<sup>28</sup> Caspase cleavage leads to the activation of proteins that contribute directly to the apoptotic program like Bid, other pro-caspases and activate several kinases like PKC  $\delta$  and  $\theta$ , MEKK-1, PAK2, MST/Krs, PKN, although their exact role in apoptosis remains elusive. Caspase cleavage will lead to the inactivation of proteins that could interfere with cell death directly such as Bcl-2, Bcl-xL and presumably p28Bap31 or indirectly such as AKT, PARP, DNA-PK, MDM2, U1-70K, Rb, p21, p27. The cleavage of

cytoskeletal proteins or proteins involved in cytoskeleton and cell-cell adhesion regulation (fodrin, actin, gelsolin, Gas2, keratins,  $\gamma$  and  $\beta$ -catenins,  $\alpha$ II and  $\alpha$ III spectrin, focal adhesion kinase) and proteins involved in maintaining the integrity of the nuclear structure (NuMA, lamins, SAF-1) contribute to cellular structural disassembly. Finally, caspase cleavage of nuclease inhibitors such as DFF/mCAD initiate the endonucleotic DNA cleavage pathway by activating nucleases like CPAN/mCAD.<sup>29-31</sup> However, other DNA fragmentation promoting activity and endonucleases are involved for complete oligonucleosome-sized DNA digestion during apoptosis.<sup>32-34</sup>

Many studies have shown that the Ced-9/Bcl-like proteins are key regulators of caspase activation and apoptosis triggered by anticancer drugs like camptothecin, etoposide, vinblastine, taxol, Ara-C, cis-platinum.<sup>35-39</sup> Clues about the molecular mechanisms by which these proteins regulate caspase activation are emerging. Though a clear understanding of how caspases are activated after death stimuli remains elusive, considerable understanding has been obtained by intensive studies on the mitochondrial pathway and CD95/APO1/Fas cell death receptor pathway of caspase activation.

#### MITOCHONDRIAL REGULATION OF CASPASE ACTIVATION

Mitochondria are considered as major players in apoptosis of mammalian cells and undergo functional and structural changes early during the death process.<sup>40</sup> Mitochondrial permeability transition (MPT), and subsequent mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) disruption, is a general feature of cells undergoing apoptosis. MPT involves the opening of permeability transition pores or mitochondria megachannels at the contact regions of the inner and outer membranes of mitochondria. These events have been detected in many different cell types after diverse apoptosis-inducing stimuli including anticancer drugs.<sup>41</sup> Permeability transition pore opening leads to the release of the mitochondrial apoptogenic factor AIF and cytochrome c.<sup>42</sup> MPT pore opening appears to culminate in large amplitude swelling of the mitochondria matrix, and both cytochrome c and AIF seem to be released from a mechanical damage of the outer mitochondrial membrane.<sup>42</sup> AIF is a protease activator that can activate caspase-3 and perhaps other caspase-3 like proteases and induces DNA fragmentation in isolated nuclei. Once liberated, AIF contributes to further induction of MPT and thus, amplifies the mitochondrial initiating signal.<sup>43</sup>

Considerable clarifications for the role of mitochondria in apoptosis have been obtained by three recent works published by Wang's group (Fig. 1). This group has established an *in vitro* system based on cytosols of growing HeLa cells in which apoptosis is initiated by the addition of dATP. Fractionation of these activated cytosol extracts and reconstitution of caspase-3 activation, a major caspase activity in apoptotic cells, leads to the purification of three apoptotic protease-activating factors termed Apaf-1, -2 and -3. Apaf-2 was identified as mitochondrial cytochrome c, Apaf-1 as the human homolog of Ced-4, and Apaf-3 as caspase-9.<sup>13,15,14</sup> All three factors are required for caspase-3 activation and DNA

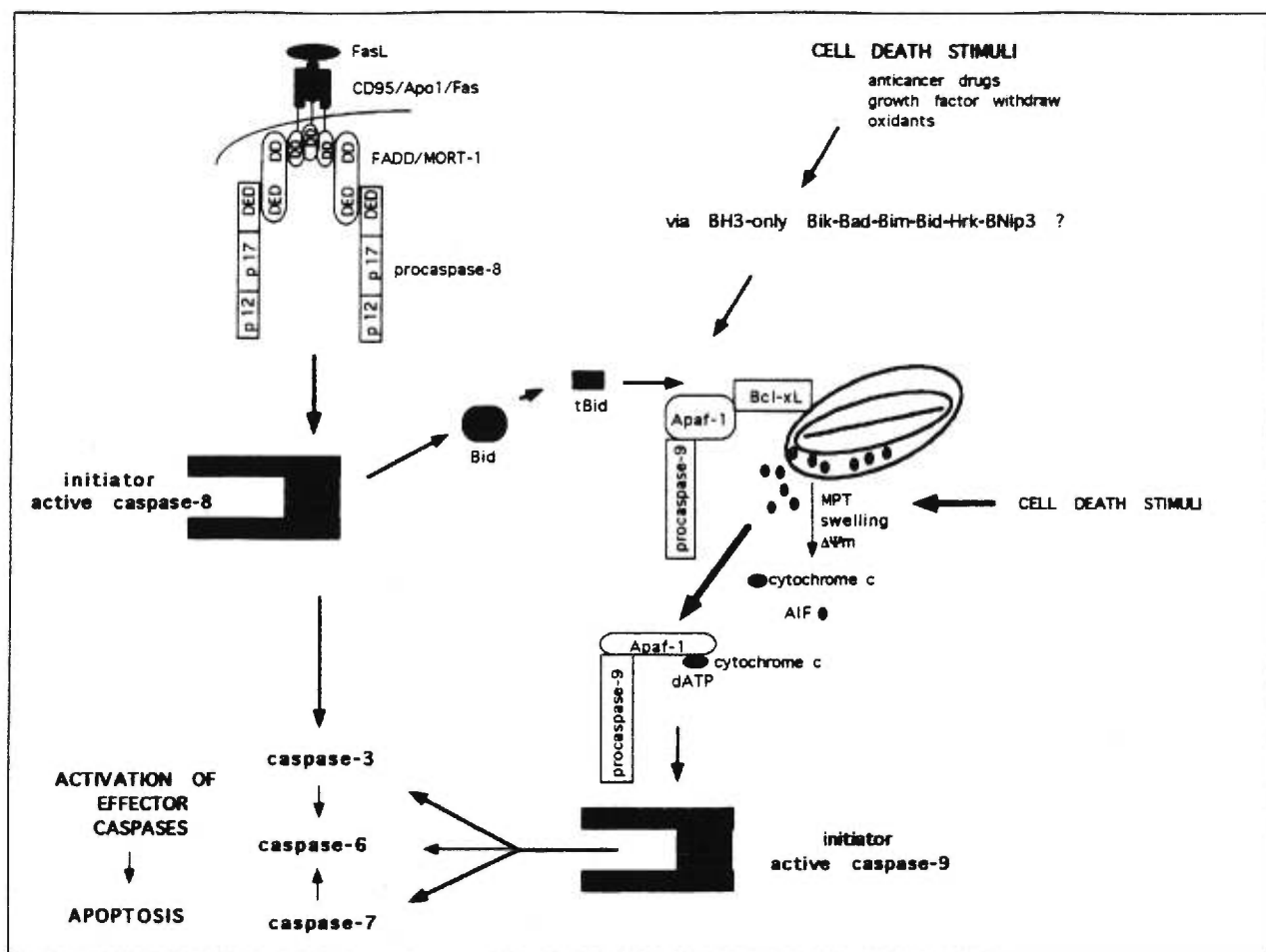


Fig. 1 Schematic diagram of caspase activation via the mitochondrial pathway and CD95/APO-1/FAS cell death receptor pathway.

fragmentation of exogenous added nuclei. Wang and coworkers have demonstrated that Apaf-1 binds to caspase-9 in the presence of dATP and cytochrome c and this interaction is mediated by the CARD domains found on the two proteins. The complex formation between Apaf-1 and caspase-9 zymogen leads to the cleavage and activation of caspase-9, probably through an autoproteolytic processing and caspase-9 in turn activates directly the effector caspase -3 and -7 (Fig. 1).<sup>15,16</sup> In this system, cytochrome c and dATP are required to generate an active Apaf-1/caspase-9 complex and a model is proposed in which cytochrome c and dATP induce conformational changes in Apaf-1 necessary to Apaf-1/caspase-9 activation. Apaf-1 and caspase-9 deficient mice have been generated and these mice exhibit many apoptosis defects with a global phenotype similar, although not identical to caspase-3 deficiency.<sup>21,22,26,27</sup> Apaf-1 and caspase-9 deficiency in vivo impaired the activation of caspase-3 but mitochondrial cytochrome c translocation appears not affected in deficient cells after DNA damage.

These results suggest that Apaf-1 and caspase-9 act downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation and are consistent with their functional interactions shown in vitro. Wang's group has shown that caspase-9

is the protease that lies immediately downstream of Apaf-1. It has been shown also that Apaf-1 could interact in vivo with other caspases containing long prodomain like caspase -8 and -4.<sup>17</sup> Similarly, its homolog ced-4 interacts with caspase-8.<sup>18</sup> However, others have revealed that none of the other CARD-and DED-containing caspases, such as caspase -1, -2, -4, -8, -10 and -13, were activated in the presence of Apaf-1, cytochrome c and dATP indicating the high specificity of the Apaf-1/caspase 9 activating apparatus.<sup>15</sup>

Cytochrome c release from mitochondria is an early event in the initiation of the apoptotic program. It has been shown that Bcl-2 and Bcl-xL overexpression prevents caspase-3 like protease activation and apoptosis by blocking cytochrome c translocation from mitochondria to the cytosol,<sup>16,19</sup> whereas overexpression of the proapoptotic protein Bax- $\alpha$  induces release of cytochrome c.<sup>19</sup> Many data correlate an MPT-mediated  $\Delta\Psi_m$  disruption with induction of apoptosis and suggest that the antiapoptotic Ced-9/Bcl-like proteins suppress apoptosis through inhibition of MPT,<sup>20</sup> whereas the proapoptotic Bax protein that binds to the MPT pore complex can induce loss of mitochondrial membrane potential and promotes cytochrome c release and caspase activation.<sup>20,21</sup> Mitochondrial cytochrome c release, however, can

occur independently of MPT and dissipation of the voltage gradient  $\Delta\psi_m$ .<sup>60,62</sup> Although the mechanisms by which cytochrome c is translocated from mitochondria remain elusive, mitochondrial volume dysregulation with matrix swelling in response to death stimuli leads to outer-mitochondrial membrane rupture that results in the translocation of intermembrane proteins to the cytosol and these events can occur while  $\Delta\psi_m$  is maintained.<sup>12</sup> Bcl-xL and perhaps Bcl-2 function to prevent the loss of outer membrane integrity possibly via their ion channel activity and so impede mitochondrial cytochrome c release.<sup>9</sup> Since it was shown that caspases can directly induce permeability transition and that caspase inhibitors block MPT under certain circumstances, mitochondrial  $\Delta\psi_m$  disruption resulting from caspase activation may amplify the initial signal triggered by cytochrome c/Apaf1/caspase-9 complex.<sup>32,34</sup>

Direct interaction between Bcl-xL and cytochrome c has been shown.<sup>8</sup> Bcl-xL interacts also with Apaf-1/caspase 9 and inhibits the oligomerization and activation of caspase-9.<sup>16,17</sup> Moreover, Apaf-1-dependent activation of caspase-9 is inhibited by recombinant Bcl-xL in a dose dependent manner.<sup>17</sup> Ced-4-induced apoptosis by ectopic expression in mammalian cells is abrogated by Ced-9 and Bcl-xL. Ced-4 interacts with ced-9 and Bcl-xL and the proapoptotic proteins Bax, Bik and Bak disrupt the Ced-4/Bcl-xL interaction.<sup>14</sup> Like Bcl-xL and Bcl-2, ced-9 protein localizes primarily to intracellular membranes. Coexpression of ced-4 and ced-9 into cells results in a shift in the cellular distribution of ced-4 protein from the cytoplasmic compartment to a membrane fraction enriched in mitochondria.<sup>34</sup> These results suggest an alternate mechanism of regulation of caspase activation by ced-9/bcl-like proteins at mitochondrial level; ced-9/bcl-like proteins may interact with and sequester the essential molecules (Apaf-1, cytochrome c) implicated in the initiation phase of caspase activation (Fig. 1). Such a mechanism could explain the protection from apoptosis induced by microinjected cytochrome c in cells overexpressing Bcl-2.<sup>35</sup>

#### CELL DEATH RECEPTOR-MEDIATED CASPASE ACTIVATION

Activation of some cell surface death receptors can lead to a near-to-immediate activation of initiator caspases and subsequent cell death. This growing novel family of cell death receptors includes TNF-R1, CD95/APO-1/Fas, DR-3/WSL-1/TRAMP/LARD/APO-3, DR-4/TRAIL-R1, DR-5/TRAIL-R2 and DR-6.<sup>36-37</sup> These receptors are characterized by the presence of a death domain (DD) in their cytoplasmic region and the ability to transduce proliferative and/or apoptotic signals by recruiting cytoplasmic proteins that contain a similar DD motif. The death-signaling pathways emerging from aggregation of the cell surface receptor CD95/APO-1/Fas and TNF-R1 are the best characterized. For Fas, stimulation by its natural ligand or by agonist antibodies leads to the formation of a death-inducing signaling complex (DISC). The DISC contains FADD/MORT-1, a Fas-associated death domain adapter protein that binds to the aggregated receptor through its C-terminal DD. FADD/MORT-1 also contains a N-terminal death effector domain and recruits caspase-8 or -10

proenzyme through a DED-DED interaction (Fig. 1). Once caspase-8 zymogen is recruited to the DISC, it is proteolytically processed to the active protease containing p17 and p12 subunits and released from the DISC.<sup>36</sup> Recent data suggest that caspase-8 activation at the DISC occurs by autoprocessing after oligomerization of the zymogen.<sup>38</sup> Active caspase-8 in turn can process other downstream effector caspases like caspase-3.<sup>39</sup>

Similarly, oligomerization of TNF-R1 by TNF- $\alpha$  binding induces a DISC with recruitment of the adapter molecule TRADD (TNFR-associated death domain) that recruits FADD that binds to caspase-8. Alternatively, TRADD can recruit caspase-2 via the TRADD/RIP/CRADD/RAIDD complex. Caspase-8 activation after CD95/Fas engagement is the initiator step of a protease cascade amplification that leads to an irreversible point resulting in cellular disassembly. Whether mature caspase-8 cleaves and activates directly downstream effector caspases or whether the amplifying step involves the mitochondrial apoptotic pathway remain unresolved questions. It has been shown in some cell types that Fas-induced apoptosis is not inhibitable by Bcl-2 and/or Bcl-xL.<sup>60</sup> These results suggest that in some cells, caspase-8 activates directly downstream effector caspases in a mitochondria-independent manner and that Fas can trigger an apoptotic pathway that bypasses the CED-9/Bcl-like mitochondrial checkpoint. However, other studies show that CED-9/Bcl-like family members can inhibit CD95/Fas-mediated apoptosis.<sup>61,62</sup> In MCF7-Fas cells overexpressing Bcl-xL, caspase-8 is processed normally after anti-Fas or TNF- $\alpha$  stimulation but cells are protected from apoptosis. Moreover, apoptosis induced by microinjection of recombinant active caspase-8 is inhibited by Bcl-xL suggesting that Bcl-xL blocks apoptosis downstream of caspase-8 activation.<sup>61</sup>

Susin and coworkers have proposed a pathway for Fas-induced apoptosis that involves a Bcl-2-non-inhibitable mitochondrial effector phase.<sup>63</sup> In this scenario, Fas-crosslinking and subsequent activation of caspase-8 lead to activation of downstream caspases that induce MPT and  $\Delta\psi_m$  disruption. These events cause the release of mitochondrial AIF that acts as an effector protease and induces DNA fragmentation, or contributes to further induction of MPT and activation of downstream effector caspases like caspase-3. In mitochondria overexpressing Bcl-2, caspase-induced MPT and AIF release occurs to a similar extent as in control mitochondria, providing an explanation for the failure of Bcl-2 to inhibit Fas-mediated apoptosis in some cells. In a cell-free system based on *Xenopus* egg extracts in which apoptosis requires mitochondria, it has been shown that high concentration of active caspase-8 triggers apoptosis through a mitochondria-dependent and -independent pathway. In this system, a small amount of active caspase-8 triggers the apoptotic process, predominantly, if not exclusively, through the mitochondria-dependent pathway that is inhibitable by Bcl-2. In this mitochondria-dependent context, the inhibitory effect of Bcl-2 on cytochrome c translocation can be lost if sufficient amount of caspase-8 is added to the extract.

These results support a model in which the mitochondrial release of cytochrome c amplifies signals initiated by caspase-8.<sup>64</sup> The inhibitory effect of CED-9/Bcl-like on this amplification loop is bypassed if sufficient amount of

caspase-8 is activated at the initiation step that leads to direct activation of the effector caspase-3.<sup>59</sup> Scaffidi and al. have recently defined two cell types based on the dependence of caspase activation and apoptosis on mitochondrial function in CD95-mediated apoptosis. In type I cells, caspase-8 is activated at the DISC level and promotes activation of caspase-3 in a mitochondria-independent manner. In type II cells, strong activation of caspase-8 and caspase-3 occurs downstream of mitochondria activation and requires mitochondrial function. In these type II cell lines, CD95-mediated apoptosis is inhibited by Bcl-2 and Bcl-xL.<sup>65</sup> According to the model, inhibition of CD95-triggered apoptosis by Bcl-xL downstream of a strong activation of caspase-8 in MCF7-Fas cells is explained by a deficiency in caspase-3 expression.<sup>61</sup> The lack of sufficient amount of caspase-3 would impede a direct activation of downstream caspases by caspase-8 and thus engages the CED-9/Bcl-like inhibitable mitochondrial pathway.

More direct information about the role of caspase-8 in apoptosis triggered by CD95/Fas/APO-1, TNF-R1 and DR-3/WSL-1/TRAMP/LARD/APO-3 is provided by caspase-8 deficient mice.<sup>30</sup> In this recent work, Varfolomeev and coworkers show that fibroblasts derived from the caspase-8<sup>-/-</sup> embryos are resistant to apoptosis induced by TNF-R1, CD95/Fas/APO-1 and DR-3/WSL-1/TRAMP/LARD/APO-3 receptors. This study suggests a central role of caspase-8 for these cell death receptor signaling pathways, and supports a model in which caspase-8 activation at the DISC level, is the initiation step. Recently, two independent studies established a molecular link between the activated caspase-8 at the CD95 receptor and the mitochondrial death machinery.<sup>66,67</sup> In these studies, it has been shown that the BH3-containing death agonist Bid protein is a specific proximal substrate of caspase-8 during Fas-induced apoptosis. Cleavage of Bid by caspase-8 yields a C-terminal, BH3-containing fragment (tBID) that activates downstream mitochondrial apoptotic events. After cleavage by caspase-8, tBID translocates onto mitochondria where it colocalizes with Bcl-xL, leading to cytochrome c release,  $\Delta\psi_m$  disruption, and ultimately cell shrinkage and nuclear condensation (Fig. 1). tBID-induced mitochondrial damage is antagonized by Bcl-xL or Bcl-2 overexpression. These results provide new evidence for the involvement of the mitochondrial death pathway in apoptosis triggered by CD95/Fas/APO-1 receptor. Apaf-1/caspase-9 complex has been described as the upstream activator of caspase-3 and -7 in cytochrome c mediated apoptosis.<sup>15</sup> However, Apaf-1 deficient thymocytes or activated T lymphocytes and caspase-9 deficient thymocytes remained sensitive to CD95-mediated apoptosis.<sup>21,22,26,27</sup> These results do not necessarily rule out the mitochondrial implication in CD95-induced apoptosis but suggest that other caspases and/or Apaf-1 homologs might be implicated in this pathway.

#### CASPASE ACTIVATION IN CHEMOTHERAPY-INDUCED APOPTOSIS

Several studies have revealed the activation of various caspases in cells treated with anticancer drugs and generally the effector caspase-3, -7 and -6 but also caspase -9, -2 and in some cases -8, are found activated.<sup>27,33,38,39,68-71</sup> Although, the

precise molecular mechanisms triggered by apoptosis-inducing agents used in cancer therapy remain unknown, many studies strongly suggest now that the mitochondrial pathway of caspase activation plays the central role in cell death induced by genotoxic drugs (Fig. 2).

1. Chemotherapeutic agents, including the DNA topoisomerase I and II inhibitors camptothecin and etoposide, the antimetabolites 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine (cytarabine) and 2-chloroadenosine, the anthracycline antibiotic doxorubicin and the microtubule-disrupting agent paclitaxel, induce mitochondrial  $\Delta\psi_m$  disruption that is inhibitable by Bcl-2 and Bcl-xL.<sup>11</sup>
2. The ced-9/Bcl-like protein members are key regulators of caspase activation and downstream nuclear events in apoptosis triggered by a variety of drugs like camptothecin, etoposide, vinblastine, paclitaxel, cisplatin and cytarabine.<sup>35-39</sup>
3. Mitochondrial cytochrome c release before or concurrent with caspase activation is observed in different cell types after drug treatments.<sup>46,47</sup>
4. Overexpression of Bcl-xL or Bcl-2 antagonizes cytochrome c release from mitochondria and subsequent caspase-3 activation triggered by anticancer drugs.<sup>46,47</sup>
5. Apaf-1 overexpression sensitizes cancer cells to paclitaxel or etoposide and this is accompanied with increased caspase-9 and -3 activities.<sup>75</sup>
6. Cells deficient in Apaf-1 or caspase-9 are protected from apoptosis induced by anticancer drugs such as cisplatin and etoposide<sup>21,27</sup> whereas cells deficient in caspase-8 and -2 show no protecting effect against anticancer drugs such as etoposide or doxorubicin.<sup>18,20</sup> Cells deficient for caspase-3 show only reduced chemosensitivity to doxorubicin suggesting that other effector caspases can compensate for caspase-3<sup>19</sup> (perhaps caspase-7).

In some cells, a cross-resistance between anticancer drugs and CD95-mediated apoptosis is observed. This observation reflects alterations in common downstream components of the apoptotic pathways triggered by CD95 and DNA damaging agents or suggests that drug-induced apoptosis could be mediated in some cases by the death receptor Fas signaling pathway. The implication of the CD95 death pathway in chemotherapy-mediated apoptosis remains an unresolved question documented by controversial data. Some data suggest that the CD95-receptor system plays a central role in apoptosis induced by anticancer drugs with different mechanisms of action. For example, it has been shown in neuroblastoma cells that cytotoxic compounds such as etoposide, doxorubicin and cisplatin lead to induction of CD95-L and upregulation of CD95 receptor by de novo gene expression. In addition, treatment of these cells with F(ab')<sub>2</sub> anti-CD95 antibody fragments that interfere with CD95 receptor/ligand interaction, strongly reduces apoptosis induced by cytotoxic drugs, suggesting that the cell-death mechanism activated requires the CD95 death-signaling pathway.<sup>76</sup> Involvement of the CD95 death pathway in drug-induced-apoptosis is suggested also by studies in leukemia and hepatoma cells.<sup>77</sup>

The molecular mechanism that leads to the activation of the CD95 cell-surface death receptor after genotoxic stresses



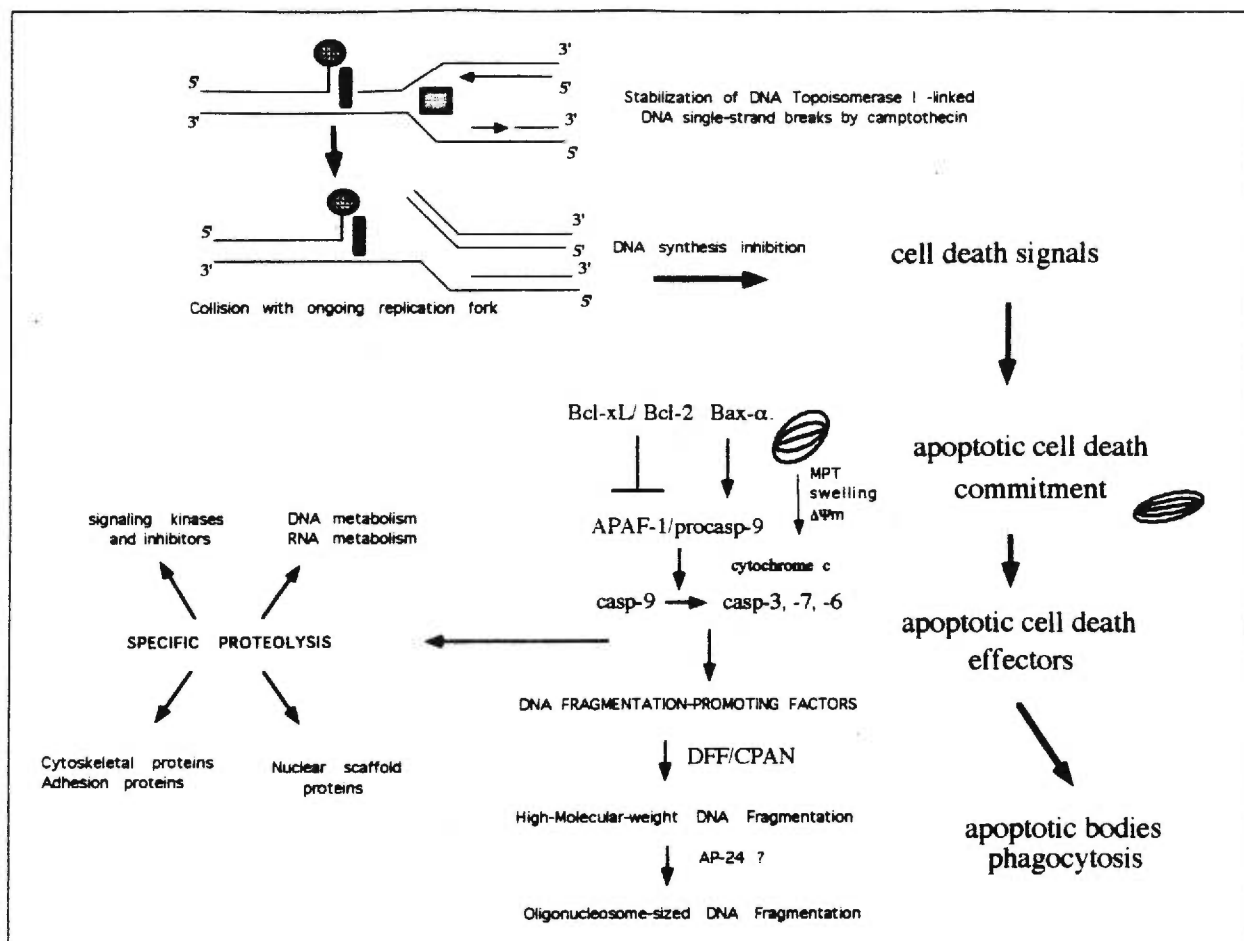


Fig. 2 Schematic representation of activation and role of caspases in apoptosis mediated by the DNA topoisomerase I inhibitor camptothecin.

remains obscure. Herr and coworkers showed that ceramides strongly induce apoptosis, CD95 expression and caspase activation. CD95 signaling is required for ceramide-induced apoptosis because inactivation of the CD95 pathway by dominant negative FADD or antisense strategy leads to a strong reduction of cell death mediated by ceramides. In fibroblasts from Niemann-Pick patients, that present a deficiency of the acid sphingomyelinase gene, ceramide production and apoptosis after doxorubicin treatment is strongly reduced and these cells fail to upregulate CD95-L. In these cells, stimulation with exogenous C2-ceramide induces CD95-L expression and apoptosis; moreover, a direct activation of the CD95 receptor with an agonist antibody induces apoptosis. These data indicate that the activation of the CD95 receptor/ligand system in anticancer drug-induced apoptosis is mediated by the sphingomyelin pathway.<sup>78</sup> However, several findings show that chemotherapeutic agents trigger apoptosis independently of Fas signaling. For example, etoposide, doxorubicin, methotrexate, topotecan and cisplatin triggered apoptosis in Fas-resistant Jurkat cells and apoptosis activation was comparable to that of parental cells.<sup>79</sup>

It has been shown that fludarabine-, doxorubicin- and cisplatin-induced apoptosis in human CEM cells is

accompanied by upregulation of Fas-L expression. However, in these cells, inhibition of CD95 signaling pathway by CrmA expression or application of neutralizing anti-Fas/FasL antibodies did not inhibit apoptosis induced by these agents.<sup>80</sup> The Fas-independent mechanism of chemotherapy-induced caspase activation is also highlighted by studies using caspase-8 or FADD/MORT-1 deficient cells<sup>81,82</sup> and in cells overexpressing CrmA, a potent inhibitor of the initiator caspase-8.<sup>82,83</sup> From all these studies, it appears that the implication of the Fas signaling system after chemotherapy remains questionable. Some studies suggest that it could participate in some cases but most of the studies indicate that it is not essential for the activation of caspases and apoptosis in cells treated with anticancer agents. However, gene activation, processing and secretion of FasL or other death ligands by treated cells during drug treatment may have significant effects clinically on neighboring and even distant cells in humans.

#### FUTURE PERSPECTIVES

Although we understand better how caspases are activated following anticancer drug treatment, the exact mechanisms

by which different drugs that mediate different types of damage, converge on the mitochondrial pathway of caspase activation remain elusive. The search to identify signals that link chemotherapy to alterations in mitochondria is just beginning. Strategies to overcome drug resistance to cancer treatment could involve the induction of apoptosis through caspase activation. Several strategies can be envisioned to promote caspase activation in tumor cells. First, new compounds that block the activity of the antiapoptotic members of the Ced-9/Bcl family such as Bcl-2 and Bcl-xL may be designed.<sup>5</sup> Such compound could be targeted to the BH4 domain to prevent the interaction of antiapoptotic proteins with adapter molecules like Apaf-1 or putative close homologs. An alternate approach could be to design drugs that will impede the pore-forming domain of Bcl-xL or Bcl-2 that lies between the two central hydrophobic  $\alpha$ -helices,  $\alpha 5$  and  $\alpha 6$ . Third, new compounds that act on the mitochondria megachannels are expected to promote the dysfunction of mitochondria and thus provoke AIF or cytochrome c release that accelerate caspase-9 activation. Several proteins that form the MPT pores may be targeted such as the adenine nucleotide translocator protein (ANT), porins and cyclophilin D.<sup>11</sup> An other alternative approach is to design agents that will activate the death receptor complexes associated with some initiator caspases.<sup>36</sup> The persistence of growth factor dependency in malignant cells transformed by oncogenes is a central feature of cancer cell growth. Inhibition of these growth-factor signaling pathways leads to caspase activation and apoptosis in cancer cells.<sup>44</sup> Therefore, antigrowth factor cancer therapies may be an additional strategy to promote tumor cell death. The main challenge for all these strategies is selectivity. Understanding how apoptosis is regulated in specific cancer cells may lead to the development of new strategies to circumvent drug resistance in cancer specific tumors.

#### Acknowledgements

Work in RB laboratory is supported by funds from the Medical Research Council of Canada (MT-15019), the National Cancer Institute of Canada (009352) and the Cancer Research Society Inc (Montreal, Que).

Received 7 December 1998; Revised 28 December 1998;

Accepted 29 December 1998

Correspondence to: Richard Bertrand; Hospital Research Center of University of Montreal, Notre-Dame Hospital, 1560 Sherbrooke St. East, Room Y-5634, Montreal (Quebec) H2L 4M1, Canada. Tel: (514) 281 6000 ext 6615; Fax: (514) 896 4689; E-mail: r\_b Bertrand@videotron.ca

#### References

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239–257.
- Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and disease - Regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Ann Rev Med* 1997;48:267–281.
- Reed JC. Bcl-2 family proteins - Regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Seminars in Hematology* 1997;34:9–19.
- Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992;356:494–496.
- Yuan J, Horvitz HR. The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 1992;116:309–320.
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S et al. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. *Cell* 1993;75:641–652.
- Conradt B, Horvitz HR. The *C. elegans* protein Egl-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein Ced-9. *Cell* 1998;93:519–529.
- Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family - regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998;16:395–419.
- Reed JC, Jurgensmeier JM, Matsuyama S. BCL-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:127–137.
- Alnemri ES. Mammalian cell death proteases - a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* 1997;64:33–42.
- Cryns V, Yuan JY. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998;12:1551–1570.
- Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 1998;1387:17–31.
- Zou H, Henzel WJ, Liu XS et al. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* Ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997;90:405–413.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM. Interaction of Ced-4 with Ced-3 and Ced-9 - a molecular framework for cell death. *Science* 1997;275:1122–1126.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479–489.
- Pan GH, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase-9, Bcl-X-L, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 1998;273:5841–5845.
- Hu YM, Benedict MA, Wu DY, Inohara N, Nunez G. Bcl-X-L interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998;95:4386–4391.
- Bergeron L, Perez GI, Macdonald G et al. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Devel* 1998;12:1304–1314.
- Kuida K, Zheng TS, Na SQ et al. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in Cpp32-deficient mice. *Nature* 1996;384:368–372.
- Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V et al. Targeted disruption of the mouse caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and Dr3 and is lethal prenatally. *Immunity* 1998;9:267–276.
- Kuida K, Haydar TF, Kuan CY et al. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 1998;94:325–337.
- Hakem R, Hakem A, Duncan GS et al. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 1998;94:339–352.
- Kuida K, Lippke JA, Ku G et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 1995;267:2000–2003.

24. Wang SY, Miura M, Jung YK, Zhu H, Li E, Yuan JY. Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* 1998;92:501-509.
25. Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G. Subcellular and submitochondrial mode of action of bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* 1998;16:2265-2282.
26. Cecconi F, Alvarezbolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P. Apaf-1 (Ced-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 1998;94:727-737.
27. Yoshida H, Kong YY, Yoshida R et al. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 1998;94:739-750.
28. Thornberry NA, Rano TA, Pieterse EP et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B - functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:17907-17911.
29. Liu XS, Zou H, Slaughter C, Wang XD. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997;89:175-184.
30. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata SA. Caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43-50.
31. Halenbeck R, Macdonald H, Roulston A, Chen TT, Conroy L, Williams LT. CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. *Curr Biol* 1998;8:537-540.
32. Wright SC, Wei QS, Zhong J, Zheng H, Kinder DH, Larrick JW. Purification of a 24-kD protease from apoptotic tumor cells that activates DNA fragmentation. *J Exp Med* 1994;180:2113-2123.
33. Sane AT, Bertrand R. Distinct steps in DNA fragmentation pathway during camptothecin-induced apoptosis involved caspase-, benzoyloxycarbonyl- and N-tosyl-L-phenylalanylchloromethyl ketone-sensitive activities. *Cancer Res* 1998;58:3066-3072.
34. Yoshida A, Pourquier P, Pommier Y. Purification and characterization of a Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease (AN34) from etoposide-treated human leukemia HL-60 cells undergoing apoptosis. *Cancer Res* 1998;58:2576-2582.
35. Dole MG, Jasty R, Cooper MJ, Thompson CB, Nunez G, Castle VP. Bcl-X(L) is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1995;55:2576-2582.
36. Ibrado AM, Huang Y, Fang GF, Bhalla K. Bcl-X(L) overexpression inhibits taxol-induced YAMA protease activity and apoptosis. *Cell Growth Diff* 1996;7:1087-1094.
37. Simonian PL, Grillot DAM, Nunez G. Bcl-2 and Bcl-XL can differentially block chemotherapy-induced cell death. *Blood* 1997;90:1208-1216.
38. Schmitt E, Cimoli G, Steyaert A, Bertrand R. Bcl-xL modulates apoptosis induced by anticancer drugs and delays DEVDase and DNA fragmentation-promoting activities. *Exp Cell Res* 1998;240:107-121.
39. Schmitt E, Steyaert A, Cimoli G, Bertrand R. Bax-alpha promotes apoptosis induced by cancer chemotherapy and accelerates the activation of caspase 3-like cysteine proteases in p53 double mutant B lymphoma Namalwa cells. *Cell Death Diff* 1998;5:506-516.
40. Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis - doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:151-165.
41. Decaudin D, Marzo I, Brenner C, Kroemer G. Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis - a prospective novel target of cancer therapy. *Int J Oncol* 1998;12:141-152.
42. Vanderheiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-X(L) regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997;91:627-637.
43. Liu X, Kim CN, Yang J, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-157.
44. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1998;1:949-957.
45. Pan GH, Humke EW, Dixit VM. Activation of caspases triggered by cytochrome c in vitro. *FEBS Letters* 1998;426:151-154.
46. Kluck RM, Bossywetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria - a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-1136.
47. Yang J, Liu XS, Bhalla K et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2 - release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-1132.
48. Kharbanda S, Pandey P, Schofield L et al. Bcl-X(L) as an inhibitor of cytosolic cytochrome c accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1997;94:6939-6942.
49. Rosse T, Olivier R, Monney L et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 1998;391:496-499.
50. Xiang JL, Chao DT, Korsmeyer SJ. Bax-induced cell death may not require interleukin 1-beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1996;93:14559-14563.
51. Jurgensmeier JM, Xie ZH, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1998;95:4997-5002.
52. Bossywetzel E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome C release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J* 1998;17:37-49.
53. Marzo I, Susin SA, Petit PX et al. Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function. *FEBS Letters* 1998;427:198-202.
54. Wu DY, Wallen HD, Nunez G. Interaction and regulation of subcellular localization of Ced-4 by Ced-9. *Science* 1997;275:1126-1129.
55. Zhivotovsky B, Orrenius S, Brustugun OT, Doskeland SO. Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature* 1998;391:449-450.
56. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors - signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308.
57. Pan GH, Bauer JH, Haridas V et al. Identification and functional characterization of Dr6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Letters* 1998;431:351-356.
58. Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 1998;273:2926-2930.
59. Stennicke HR, Jurgensmeier JM, Shin H et al. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* 1998;273:27084-27090.
60. Strasser A, Harris AW, Huang DCS, Krammer PH, Cory S. Bcl-2 and Fas/Apo-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J* 1995;14:6136-6147.
61. Srinivasan A, Li F, Wong A et al. Bcl-X(L) functions downstream of caspase-8 to inhibit Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis of MCF-7 breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998;273:4523-4529.
62. Boise LH, Thompson CB. Bcl-X(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1997;94:3759-3764.



63. Susin SA, Zamzami N, Castedo M et al. The central executioner of apoptosis – multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/Apo-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med* 1997;186:25–37.
64. Kuwana T, Smith JJ, Muzio M, Dixit VM, Newmeyer DD, Kornbluth S. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* 1998;273:16589–16594.
65. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A et al. Two CD95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998;17:1675–1687.
66. Li HL, Zhu H, Xu CJ, Yuan JY. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491–501.
67. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang XD. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998;94:481–490.
68. Datta R, Banach D, Kojima H et al. Activation of the CPP32 protease in apoptosis induced by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and other DNA-damaging agents. *Blood* 1996;88:1936–1943.
69. Dubrez L, Savoy I, Hamman A, Solary E. Pivotal role of a DEVD-sensitive step in etoposide-induced and Fas-mediated apoptotic pathways. *EMBO J* 1996;15:5504–5512.
70. Macfarlane M, Cain K, Sun XM, Alnemri ES, Cohen GM. Processing/Activation of at least four interleukin-1-beta converting enzyme-like proteases occurs during the execution phase of apoptosis in human monocytic tumor cells. *J Cell Biol* 1997;137:469–479.
71. Faleiro L, Kobayashi R, Fearnhead H, Lazebnik Y. Multiple species of Cpp32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *EMBO J* 1997;16:2271–2281.
72. Martins LM, Kottke T, Mesner PW et al. Activation of multiple interleukin-1-beta converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:7421–7430.
73. Droin N, Dubrez L, Eymin B et al. Upregulation of casp genes in human tumor cells undergoing etoposide-induced apoptosis. *Oncogene* 1998;16:2885–2894.
74. Fulda S, Susin SA, Kroemer G, Debatin KM. Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1998;58:4453–4460.
75. Perkins C, Kim CN, Fang GF, Bhalla KN. Overexpression of Apaf-1 promotes apoptosis of untreated and paclitaxel- or etoposide-treated HL-60 cells. *Cancer Res* 1998;58:4561–4566.
76. Fulda S, Sieverts H, Friesen C, Herr I, Debatin KM. The CD95 (Apo-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1997;57:3823–3829.
77. Muller M, Strand S, Hug H et al. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (Apo-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest* 1997;99:403–413.
78. Herr I, Wilhelm D, Bohler T, Angel P, Debatin KM. Activation of CD95 (Apo-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. *EMBO J* 1997;16:6200–6208.
79. Eischen CM, Kottke TJ, Martins LM et al. Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells – chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood* 1997;90:935–943.
80. Villunger A, Egle A, Kos M et al. Drug-induced apoptosis is associated with enhanced Fas (Apo-1/CD95) ligand expression but occurs independently of Fas (Apo-1/CD95) signaling in human T-acute lymphatic leukemia cells. *Cancer Res* 1997;57:3331–3334.
81. Yeh WC, Delapomp JL, McCurrach ME et al. Fadd – essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 1998;279:1954–1958.
82. Smith KGC, Strasser A, Vaux DL. CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/Apo-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease. *EMBO J* 1996;15:5167–5176.
83. Sané AT, Schmitt E, Steyaert A, Meyer D, Bertrand R. The CrmA- and TPCK-sensitive pathways that trigger oligonucleosome-sized DNA fragmentation in camptothecin-induced apoptosis – relation to caspase activation and high molecular weight DNA fragmentation. *Biochem Cell Biol* 1997;75:359–358.
84. Baserga R. Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell* 1994;79:927–930.

**BIBLIOGRAPHIE**

- Adjei, P.N., Kaufmann, S.H., Leung, W.Y., Mao, F. & Gores, G.J. (1996). Selective Induction Of Apoptosis In Hep 3b Cells By Topoisomerase I Inhibitors - Evidence For a Protease-Dependent Pathway That Does Not Activate Cysteine Protease P32. *Journal of Clinical Investigation*, 98, 2588-2596.
- Alderson, M.R., Tough, T.W., Davis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K.A., Goodwin, R.G., Smith, C.A., Ramsdell, F. & Lynch, D.H. (1995). Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 181, 71-7.
- Alnemri, E.S. (1997). Mammalian Cell Death Proteases - a Family Of Highly Conserved Aspartate Specific Cysteine Proteases. *Journal of Cellular Biochemistry*, 64, 33-42.
- Alnemri, E.S., Fernandes-Alnemri, T. & Litwack, G. (1995). Cloning and expression of four novel isoforms of human interleukin-1 beta converting enzyme with different apoptotic activities. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 4312-7.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87, 171.

- Altieri, D.C. (1995). Proteases and Protease Receptors in Modulation of Leukocytes Effector Functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 58, 120-127.
- Ashkenas, J. & Werb, Z. (1996). Proteolysis and the Biochemistry of Life-or-Death Decisions. *The Journal of Experimental Medicine*, 183, 1947-1951.
- Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. (1998). Death Receptors - Signaling and Modulation [Review]. *Science*, 281, 1305-1308.
- Attardi, L.D., Lowe, S.W., Brugarolas, J. & Jacks, T. (1996). Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *The EMBO Journal*, 15, 3693-3701.
- Barry, M.A., Behnke, C.A. & Eastman, A. (1990). Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochemical Pharmacology*, 40, 2353-2362.
- Baserga, R. (1994). Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell*, 79, 927-30.
- Beere, H.M., Chresta, C.M., Alejo-Herberg, A., Skladanowski, A., Dive, C., Larsen, A.K. & Hickman, J.A. (1995). Investigation of the mechanism of higher order chromatin fragmentation observed in drug-induced apoptosis. *Molecular Pharmacology*, 47, 986-96.
- Beere, H.M., Chresta, C.M. & Hickman, J.A. (1996). Selective Inhibition Of Topoisomerase II By Icrf-193 Does Not Support a Role For

Topoisomerase II Activity In the Fragmentation Of Chromatin During Apoptosis Of Human Leukemia Cells. *Molecular Pharmacology*, 49, 842-851.

Bergeron, L., Perez, G.I., Macdonald, G., Shi, L.F., Sun, Y., Jurisicova, A., Varmuza, S., Latham, K.E., Flaws, J.A., Salter, J.C.M., Hara, H., Moskowitz, M.A., Li, E., Greenberg, A., Tilly, J.L. & Yuan, J.Y. (1998). Defects In Regulation Of Apoptosis In Caspase-2-Deficient Mice. *Genes & Development*, 12, 1304-1314.

Berke, G. (1994). The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annual Review of Immunology*, 12, 735-73.

Berke, G. (1995). The CTL's kiss of death. *Cell*, 81, 9-12.

Bertrand, R., Kerrigan, D., Sarang, M. & Pommier, Y. (1991a). Cell death induced by topoisomerase inhibitors: role of calcium in mammalian cells. *Biochemical Pharmacology*, 42, 77-85.

Bertrand, R., Kohn, K., Solary, E. & Pommier, Y. (1995). Detection of apoptosis-associated DNA fragmentation using a rapid and quantitative filter elution assay. *Drug Development Research*, 34, 138-144.

Bertrand, R., O'Connor, P., Kerrigan, D. & Pommier, Y. (1992). Sequential administration of camptothecin and etoposide circumvents the antagonistic cytotoxicity of simultaneous drug administration in slowly

growing human carcinoma, HT-29 cells. *European Journal of Cancer*, 28A, 743-748.

Bertrand, R. & Pommier, Y. (1995). Assessment of DNA damage in Mammalian cells by DNA filter elution methodology. In *Cell growth and apoptosis; A practical approach*, Studzinski, G.P. (ed), Vol. 159. pp. 97-118. IRL Press: New-York.

Bertrand, R., Sarang, M., Jenkin, J., Kerrigan, D. & Pommier, Y. (1991b). Differential induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor cell lines with amplified c-myc expression. *Cancer Research*, 51, 6280-6285.

Bertrand, R., Solary, E., Jenkins, J. & Pommier, Y. (1993). Apoptosis and its modulation in human promyelocytic HL-60 cells treated with DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Experimental Cell Research*, 207, 388-97.

Bird, C.H., Sutton, V.R., Sun, J.R., Hirst, C.E., Novak, A., Kumar, S., Trapani, J.A. & Bird, P.I. (1998). Selective Regulation of Apoptosis - the Cytotoxic Lymphocyte Serpin Proteinase Inhibitor 9 Protects Against Granzyme B-Mediated Apoptosis Without Perturbing the Fas Cell Death Pathway. *Molecular & Cellular Biology*, 18, 6387-6398.

Bjornsti, M.-A., Benedetti, P., Viglianti, G.A. & Wang, J.C. (1989). Expression of human DNA topoisomerase I in Yeast cells lacking yeast DNA

topoisomerase I: restoration of sensitivity of the cells to the antitumor drug camptothecin. *Cancer Research*, 49, 6318-6323.

- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. & Thompson, C.B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, 74, 597-608.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. & Wallach, D. (1996). Involvement Of Mach, a Novel Mort1/Fadd-Interacting Protease, In Fas/Apo-1- and Tnf Receptor-Induced Cell Death. *Cell*, 85, 803-815.
- Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H. & Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 7795-8.
- Brancolini, C., Benedetti, M. & Schneider, C. (1995). Microfilament Reorganization During Apoptosis - the Role Of Gas2, a Possible Substrate For Ice-Like Proteases. *EMBO Journal*, 14, 5179-5190.
- Brill, S.J., DiNardo, S., Voelkel-Meiman, K. & Sternglanz, R. (1987). Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication for transcription of ribosomal RNA [published erratum appears in Nature 1987 Apr 23-29; 326(6115): 812. *Nature*, 1987, 414-416.
- Brill, S.J. & Sternglanz, R. (1988). Transcription-dependent DNA supercoiling in yeast DNA topoisomerase mutants. *Cell.*, 54, 403-411.

- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T. & Hannon, G.J. (1995). Radiation-Induced Cell Cycle Arrest Compromised By P21 Deficiency. *Nature*, 377, 552-557.
- Bruno, S., Del Bino, G., Lassota, P., Giaretti, W. & Darzynkiewicz, Z. (1992). Inhibitors of proteases prevent endonucleolysis accompanying apoptotic death of HL-60 leukemic cells and normal thymocytes. *Leukemia*, 6, 1113-20.
- Bump, N.J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P., Licari, P., Mankovich, J., Shi, L.F., Greenberg, A.H., Miller, L.K. & Wong, W.W. (1995). Inhibition Of Ice Family Proteases By Baculovirus Antiapoptotic Protein P35. *Science*, 269, 1885-1888.
- Burgin, A.B., Jr. (1997). Can DNA Topoisomerases Be Ribonucleases? *Cell*, 91, 873-874.
- Cai, J.Y., Yang, J. & Jones, D.P. (1998). Mitochondrial Control Of Apoptosis - the Role Of Cytochrome C. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1366, 139-149.
- Canman, C.E., Gilmer, T.M., Coutts, S.B. & Kastan, M.B. (1995). Growth factor modulation of p53-mediated growth arrest versus apoptosis. *Genes & Development*, 9, 600-11.

- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S. & Reed, J.C. (1998). Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 By Phosphorylation. *Science*, 282, 1318-1321.
- Casciola-Rosen, L.A., Anhalt, G.J. & Rosen, A. (1995). Dna-Dependent Protein Kinase Is One Of a Subset Of Autoantigens Specifically Cleaved Early During Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 182, 1625-1634.
- Cecconi, F., Alvarezbolado, G., Meyer, B.I., Roth, K.A. & Gruss, P. (1998). Apaf1 (Ced-4 Homolog) Regulates Programmed Cell Death In Mammalian Development. *Cell*, 94, 727-737.
- Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B. & al., e. (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*, 256, 97-100.
- Champoux, J. (1990). Mechanistic aspects of type-I topoisomerases. In *DNA topology and its biological effects*, Wang, J.C. & Cozarelli, N.R. (eds) pp. 217-242. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor.
- Champoux, J.J. (1976). Evidence for an intermediate with a single-strand break in the reaction catalyzed by the DNA untwisting enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73, 3488-3491.
- Champoux, J.J. (1977). Strand breakage by the DNA untwisting enzyme results in covalent attachment of the enzyme to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 3800-3804.



- Champoux, J.J. (1978). Mechanism of the reaction catalyzed by the DNA untwisting enzyme: attachment of the enzyme to 3'-terminus of the nicked DNA. *Journal of Molecular Biology*, 118, 441-446.
- Chen, C.H., Nussenzweig, A., Guo, M., Kim, D., Li, G.C. & Ling, C.C. (1996). Down-Regulation Of Gadd153 By C-Myc In Rat Fibroblasts and Its Effect On Cell Growth and Radiation-Induced Apoptosis. *Oncogene*, 13, 1659-1665.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, 81, 505-12.
- Chinnaiyan, A.M., Tepper, C.G., Seldin, M.F., Orourke, K., Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Krammer, P.H., Peter, M.E. & Dixit, V.M. (1996). Fadd/Mort1 Is a Common Mediator Of Cd95 (Fas/Apo-1) and Tumor Necrosis Factor Receptor-Induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 4961-4965.
- Chiou, S.K., Rao, L. & White, E. (1994). Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis [published erratum appears in Mol Cell Biol 1994 Jun;14(6):4333]. *Molecular & Cellular Biology*, 14, 2556-63.
- Clarke, A.R., Gledhill, S., Hooper, M.L., Bird, C.C. & Wyllie, A.H. (1994). p53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation. *Oncogene*, 9, 1767-73.

- Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L. & Wyllie, A.H. (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*, 362, 849-852.
- Cohen, G.M., Sun, X.M., Fearnhead, H., MacFarlane, M., Brown, D.G., Snowden, R.T. & Dinsdale, D. (1994). Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *Journal of Immunology*, 153, 507-16.
- Cryns, V. & Yuan, J.Y. (1998). Proteases to die for [Review]. *Genes & Development*, 12, 1551-1570.
- Darmon, A.J., Ley, T.J., Nicholson, D.W. & Bleackley, R.C. (1996). Cleavage Of Cpp32 By Granzyme B Represents a Critical Role For Granzyme B In the Induction Of Target Cell Dna Fragmentation. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 21709-21712.
- Darmon, A.J., Nicholson, D.W. & Bleackley, R.C. (1995). Activation Of the Apoptotic Protease Cpp32 By Cytotoxic T-Cell-Derived Granzyme B. *Nature*, 377, 446-448.
- Datta, R., Banach, D., Kojima, H., Talanian, R.V., Alnemri, E.S., Wong, W.W. & Kufe, D.W. (1996). Activation Of the Cpp32 Protease In Apoptosis Induced By 1-Beta-D-Arabinofuranosylcytosine and Other DNA-Damaging Agents. *Blood*, 88, 1936-1943.

- Datta, R., Kojima, H., Yoshida, K. & Kufe, D. (1997). Caspase-3-Mediated Cleavage Of Protein Kinase C Theta In Induction Of Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 20317-20320.
- De Laurenzi, V., Costanzo, A., Barcaroli, D., Terrinoni, A., Falco, M., Annicchiaricopetruzzeli, M., Levrero, M. & Melino, G. (1998). Two New P73 Splice Variants, Gamma and Delta, With Different Transcriptional Activity. *Journal of Experimental Medicine*, 188, 1763-1768.
- Decaudin, D., Marzo, I., Brenner, C. & Kroemer, G. (1998). Mitochondria in Chemotherapy-induced Apoptosis - A prospective novel target of cancer [Review]. *International Journal of Oncology*, 12, 141-152.
- Deiss, L.P., Galinka, H., Berissi, H., Cohen, O. & Kimchi, A. (1996). Cathepsin D Protease Mediates Programmed Cell Death Induced By Interferon-Gamma, Fas/Apo-1 and Tnf-Alpha. *EMBO Journal*, 15, 3861-3870.
- Del Bino, G. & Darzynkiewicz, Z. (1991). Camptothecin, Teniposide, or 4'-(9-acridinylamino)-3-methanesulfon-m-anisidide, but not mitoxantrone or doxorubicin, induces degradation of nuclear DNA in the S-phase HL-60 cells. *Cancer Research*, 51, 1165-1169.
- Deng, C.X., Zhang, P.M., Harper, J.W., Elledge, S.J. & Leder, P. (1995). Mice Lacking P21(C/P1/Waf1) Undergo Normal Development, But Are Defective In G1 Checkpoint Control. *Cell*, 82, 675-684.

- Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Vanarsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S. & Reed, J.C. (1998). Iap1 Blocks Apoptotic Events Induced By Caspase-8 and Cytochrome C By Direct Inhibition Of Distinct Caspases. *EMBO Journal*, 17, 2215-2223.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. & Reed, J.C. (1997). X-Linked Iap1 Is a Direct Inhibitor Of Cell-Death Proteases. *Nature*, 388, 300-304.
- Dole, M.G., Jasty, R., Cooper, M.J., Thompson, C.B., Nunez, G. & Castle, V.P. (1995). Bcl-X(L) Is Expressed In Neuroblastoma Cells and Modulates Chemotherapy-Induced Apoptosis. *Cancer Research*, 55, 2576-2582.
- Droin, N., Dubrez, L., Eymin, B., Renvoize, C., Breard, J., Dimancheboitrel, M.T. & Solary, E. (1998). Upregulation Of Caspase Genes In Human Tumor Cells Undergoing Etoposide-Induced Apoptosis. *Oncogene*, 16, 2885-2894.
- Duan, H.J., Chinnaiyan, A.M., Hudson, P.L., Wing, J.P., He, W.W. & Dixit, V.M. (1996a). Ice-Lap3, a Novel Mammalian Homologue Of the Caenorhabditis Elegans Cell Death Protein Ced-3 Is Activated During Fas- and Tumor Necrosis Factor-Induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 1621-1625.
- Duan, H.J., Orth, K., Chinnaiyan, A.M., Poirier, G.G., Froelich, C.J., He, W.W. & Dixit, V.M. (1996b). Ice-Lap6, a Novel Member Of the Ice/Ced-3

Gene Family, Is Activated By the Cytotoxic T Cell Protease Granzyme B. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 16720-16724.

Dubrez, L., Savoy, I., Hamman, A. & Solary, E. (1996). Pivotal role of a DEVD-sensitive step in etoposide-induced and Fas-mediated apoptotic pathways. *EMBO Journal*, 15, 5504-5512.

Duguet, M., Lavenot, C., Harper, F., Mirambeau, G. & De Recondo, A.M. (1983). DNA topoisomerases from rat liver: physiological variations. *Nucleic Acids Research*, 11, 1059-1075.

Duke, R.C. & Cohen, J.J. (1986). IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Research*, 5, 289.

Eischen, C.M., Kottke, T.J., Martins, L.M., Basi, G.S., Tung, J.S., Earnshaw, W.C., Leibson, P.J. & Kaufmann, S.H. (1997). Comparison Of Apoptosis In Wild-Type and Fas-Resistant Cells - Chemotherapy-Induced Apoptosis Is Not Dependent On Fas/Fas Ligand Interactions. *Blood*, 90, 935-943.

Eizenberg, O., Faber-Elman, A., Gottlieb, E., Oren, M., Rotter, V. & Schwartz, M. (1995). Direct involvement of p53 in programmed cell death of oligodendrocytes. *EMBO Journal*, 14, 1136-44.

Eizenberg, O., Faberelman, A., Gottlieb, E., Oren, M., Rotter, V. & Schwartz, M. (1996). P53 Plays a Regulatory Role In Differentiation and

- Apoptosis Of Central Nervous System-Associated Cells. *Molecular & Cellular Biology*, 16, 5178-5185.
- El-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y. & et al. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Research*, 54, 1169-74.
- Elledge, R.M. & Lee, W.H. (1995). LIFE AND DEATH BY P53 . *Bioessays*, 17, 923-930.
- Ellis, H.M. & Horvitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44, 817-829.
- Ellis, R.E., Yuan, J. & Horvitz, H.R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annual Review of Cell Biology*, 7, 663-.
- Enari, M., Hase, A. & Nagata, S. (1995a). Apoptosis By a Cytosolic Extract From Fas-Activated Cells. *EMBO Journal*, 14, 5201-5208.
- Enari, M., Hug, H. & Nagata, S. (1995b). Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature*, 375, 78-81.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Nagata, S. (1998). A Caspase-Activated Dnase That Degrades Dna During Apoptosis, and Its Inhibitor Icad. *Nature*, 391, 43-50.
- Enari, M., Talanian, R.V., Wong, W.W. & Nagata, S. (1996). Sequential Activation Of Ice-Like and Cpp32-Like Proteases During Fas-Mediated Apoptosis. *Nature*, 380, 723-726.

- Evan, G.I., Brown, L., Whyte, M. & Harrington, E. (1995). Apoptosis and the Cell Cycle. *Current Opinion in Cell Biology*, 7, 825-834.
- Evans, C.A., Owen-Lynch, P.J., Whetton, A.D. & Dive, C. (1993). Activation of the Abelson tyrosine kinase activity is associated with suppression of apoptosis in hemopoietic cells. *Cancer Research*, 53, 1735-8.
- Faleiro, L., Kobayashi, R., Fearnhead, H. & Lazebnik, Y. (1997). Multiple Species Of Cpp32 and Mch2 Are the Major Active Caspases Present In Apoptotic Cells. *EMBO Journal*, 16, 2271-2281.
- Faucheu, C., Blanchet, A.M., Collarddutilleul, V., Lalanne, J.L. & Diuhercend, A. (1996). Identification Of a Cysteine Protease Closely Related to Interleukin-1-Beta-Converting Enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 236, 207-213.
- Faucheu, C., Diu, A., Chan, A.W., Blanchet, A.M., Miossec, C., Herve, F., Collard-Dutilleul, V., Gu, Y., Aldape, R.A., Lippke, J.A. & et al. (1995). A novel human protease similar to the interleukin-1 beta converting enzyme induces apoptosis in transfected cells. *EMBO Journal*, 14, 1914-22.
- Fernandes-Alnemri, T., Amstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G. & Alnemri, E.S. (1996). In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FDD-like

domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 7464-7469.

Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G. & Alnemri, E.S. (1994). CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 30761-4.

Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G. & Alnemri, E.S. (1995a). Mch2, a new member of the apoptotic Ced-3/Ice cysteine protease gene family. *Cancer Research*, 55, 2737-42.

Fernandes-Alnemri, T., Takahashi, A., Armstrong, R., Krebs, J., Fritz, L., Tomaselli, K.J., Wang, L., Yu, Z., Croce, C.M., Salvesson, G., Earnshaw, W.C., Litwack, G. & Alnemri, E.S. (1995b). Mch3, a Novel Human Apoptotic Cysteine Protease Highly Related to Cpp32. *Cancer Research*, 55, 6045-6052.

Fleischmann, G., Pflugfelder, G., Steiner, E.K., Javaherian, K., Howard, G.C., Wang, J.C. & Elgin, S.C. (1984). *Drosophila* DNA topoisomerase I is associated with transcriptionally active regions of the genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 6958-6962.

Fraser, M.J., Tynan, S.J., Papaioannou, A., Ireland, C.M. & Pittman, S.M. (1996). Endo-Exonuclease Of Human Leukaemic Cells - Evidence For a Role In Apoptosis. *Journal of Cell Science*, 109, 2343-2360.



- Fritsche, M., Haessler, C. & Brandner, G. (1993). Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents [published erratum appears in *Oncogene* 1993 Sep;8(9):2605]. *Oncogene*, 8, 307-18.
- Fulda, S., Susin, S.A., Kroemer, G. & Debatin, K.M. (1998). Molecular Ordering of Apoptosis Induced By Anticancer Drugs in Neuroblastoma Cells. *Cancer Research*, 58, 4453-4460.
- Garg, L. C., DiAngelo, S., Jacob, S. T. Role of DNA topoisomerase I in the transcription of supercoiled rDNA gene (1987). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 3185-3188.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*, 119, 493-501.
- Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R.V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y.Y., Kharbanda, S., Allen, H., Kamen, R., Wong, W. & Kufe, D. (1996). Proteolytic Activation Of Protein Kinase C Delta By an Ice/Ced 3-Like Protease Induces Characteristics Of Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 184, 2399-2404.
- Ghibelli, L., Maresca, V., Coppola, S. & Gualandi, G. (1995). Protease Inhibitors Block Apoptosis At Intermediate Stages - a Compared

Analysis Of Dna Fragmentation and Apoptotic Nuclear Morphology.  
*FEBS Letters*, 377, 9-14.

Gilmour, D.S. & Elgin, S.C. (1987). Localization of specific topoisomerase I interactions within the transcribed region of active heat shock genes by using the inhibitor camptothecin. *Molecular & Cellular Biology*, 7, 141-148.

Glucksmann. (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biological Review of Cambridge Phylosophical Society*, 26, 59-86.

Gore, S.D., Rowinsky, E.K., Miller, C.B., Griffin, C., Chen, T.L., Borowitz, M., Donehower, R.C., Burks, K.L., Armstrong, D.K., Burke, P.J., Grever, M.R. & Kaufmann, S.H. (1998). A Phase II Window Study of Topotecan in Untreated Patients With High Risk Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 4, 2677-2689.

Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D.E., Koch, C.J., Lowe, S.W. & Giaccia, A.J. (1996). Hypoxia-Mediated Selection Of Cells With Diminished Apoptotic Potential In Solid Tumours. *Nature*, 379, 88-91.

Grana, X. & Reddy, E.P. (1995). Cell cycle control in mammalian cells - Role of cyclins, cyclin dependent kinase (CDKS), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors . *Oncogene*, 11, 211-219.

Greenberg, A.H. (1996). Activation of Apoptosis pathways by granzyme B. *Cell Death & Differentiation*, 3, 269-274.

- Griffiths, S.D., Clarke, A.R. & Healy, L.E. (1997). Absence of p53 promotes propagation of mutant cells following genotoxic damage. *Oncogene*, 9, 603-609.
- Gupta, M., Fujimori, A. & Pommier, Y. (1995). Eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1262, 1-14.
- Haimovitz-Friedman, A., Kan, C.C., Ehleiter, D., Persaud, R.S., McLoughlin, M., Fuks, Z. & Kolesnick, R.N. (1994). Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 180, 525-35.
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G.S., Henderson, J.T., Woo, M., Soengas, M.S., Elia, A., Delapompa, J.L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S.A., Lowe, S.W., Penninger, J.M. & Mak, T.W. (1998). Differential Requirement For Caspase 9 In Apoptotic Pathways In Vivo. *Cell*, 94, 339-352.
- Halenbeck, R., Macdonald, H., Roulston, A., Chen, T.T., Conroy, L. & Williams, L.T. (1998). Cpan, a Human Nuclease Regulated By the Caspase-Sensitive Inhibitor Dff45. *Current Biology*, 8, 537-540.
- Hara, S.S., Halicka, H.D., Bruno, S., Gong, J.P., Traganos, F. & Darzynkiewicz, Z. (1996). Effect Of Protease Inhibitors On Early Events Of Apoptosis. *Experimental Cell Research*, 223, 372-384.

- Harris, C.C. (1996). Structure and function of the p53 tumor suppressor gene - Clues for rational cancer therapeutic strategies. *Journal of the National Cancer Institute*, 88, 1442-1455.
- Harris, C.C. & Hollstein, M. (1993). Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *New England Journal of Medicine*, 329, 1318-1327.
- Hartwell, L.H. & Kastan, M.B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science*, 266, 1821-8.
- Hashimoto, H., Chatterjee, S. & Berger, N.A. (1995). Inhibition Of Etoposide (Vp-16)-Induced Dna Recombination and Mutant Frequency By Bcl-2 Protein Overexpression. *Cancer Research*, 55, 4029-4035.
- Havre, P.A., Yuan, J.L., Hedrick, L., Cho, K.R. & Glazer, P.M. (1995). P53 Inactivation By Hpv16 E6 Results In Increased Mutagenesis In Human Cells. *Cancer Research*, 55, 4420-4424.
- Hecker, D., Page, G., Lohrum, M., Weiland, S. & Scheidtmann, K. (1996). Complex regulation of the DNA-binding activity of p53 by phosphorylation: Differential effects of individual phosphorylation sites on the interaction with different binding motifs. *Oncogene*, 12, 953-961.
- Henzel, M.J., Nishioka, W.K., Raymond, Y., Allis, C.D., Bazettjones, D.P. & Thng, J.P.H. (1998). Chromatin Condensation Is Not Associated With Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 24470-24478.

- Hengartner, M.O., Ellis, R.E. & Horvitz, H.R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature*, 356, 494-496.
- Hengartner, M.O. & Horvitz, H.R. (1994). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell*, 76, 665-76.
- Hetman, M., Filipkowski, R.K., Domagala, W. & Kaczmarek, L. (1995). Elevated Cathepsin D Expression In Kainate-Evoked Rat Brain Neurodegeneration. *Experimental Neurology*, 136, 53-63.
- Hickman, J.A. (1996). Apoptosis and Chemotherapy Resistance. *European Journal of Cancer*, 32A, 921-926.
- Higuchi, M., Honda, T., Proske, R.J. & Yeh, E.T.H. (1998). Regulation of Reactive Oxygen Species-Induced Apoptosis and Necrosis By Caspase 3-Like Proteases. *Oncogene*, 17, 2753-2760.
- Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K. & Sasada, M. (1998). Caspases Are Activated In a Branched Protease Cascade and Control Distinct Downstream Processes In Fas-Induced Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 187, 587-600.
- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S.A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M. & Kroemer, G. (1997). The Apoptosis-Necrosis Paradox - Apoptogenic Proteases Activated After Mitochondrial Permeability

Transition Determine the Mode Of Cell Death. *Oncogene*, 15, 1573-1581.

Hitoshi, Y., Lorens, J., Kitada, S.I., Fisher, J., Labarge, M., Ring, H.Z., Francke, U., Reed, J.C., Kinoshita, S. & Nolan, G.P. (1998). Toso, a Cell Surface, Specific Regulator Of Fas-Induced Apoptosis In T Cells. *Immunity*, 8, 461-471.

Hofmann, K., Bucher, P. & Tschopp, j. (1997). The CARD domain: A new apoptotic signaling motif. *Trends in Biochemical Sciences*, 22, 155-156.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science*, 253, 49-52.

Holm, C., Covey, J.M., Kerrigan, D. & Pommier, Y. (1989). Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cells. *Cancer Research*, 49, 6365-6368.

Horvitz, H.R., Ellis, H.M. & Sternberg, P.W. (1982). Programmed cell death in nematode development. *Neuroscience commentaries*, 1, 56-65.

Horwitz, S.B. & Horwitz, M.S. (1973). Effects of camptothecin on the breakage and repair of DNA during the cell cycle. *Cancer Research*, 33, 2834-2836.

Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S. & Liu, L.F. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 14873-14878.

- Hsiang, Y.H. & Liu, L.F. (1989). Evidence for the reversibility of cellular DNA lesion induced by mammalian topoisomerase II poisons. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 9713-9715.
- Hsiang, Y.H., Wu, H.Y. & Liu, L.F. (1988). Topoisomerases: novel therapeutic targets in cancer chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*, 37, 1801-1802.
- Hu, S.M., Snipas, S.J., Vincenz, C., Salvesen, G. & Dixit, V.M. (1998a). Caspase-14 Is a Novel Developmentally Regulated Protease. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 29648-29653.
- Hu, Y.M., Benedict, M.A., Wu, D.Y., Inohara, N. & Nunez, G. (1998b). Bcl-X-L Interacts With Apaf-1 and Inhibits Apaf-1-Dependent Caspase-9 Activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 4386-4391.
- Hughes, F.M. & Cidlowski, J.A. (1997). Utilization Of an In Vitro Assay to Evaluate Chromatin Degradation By Candidate Apoptotic Nucleases. *Cell Death & Differentiation*, 4, 200-208.
- Humke, E.W., Ni, J. & Dixit, V.M. (1998). Erice, a Novel Flice-Activatable Caspase. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 15702-15707.
- Ibrado, A.M., Huang, Y., Fang, G.F. & Bhalla, K. (1996a). Bcl-X(L) Overexpression Inhibits Taxol-Induced Yama Protease Activity and Apoptosis. *Cell Growth & Differentiation*, 7, 1087-1094.

- Ibrado, A.M., Huang, Y., Fang, G.F., Liu, L. & Bhalla, K. (1996b). Overexpression Of Bcl-2 or Bcl-X(L) Inhibits Ara-C-Induced Cpp32/Yama Protease Activity and Apoptosis Of Human Acute Myelogenous Leukemia HI-60 Cells. *Cancer Research*, 56, 4743-4748.
- Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Benedict, M.A. & Nunez, G. (1999). Identification of Regulatory and Catalytic Domains in the Apoptosis Nuclease DFF40/CAD. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 270-274.
- Jaxel, C., Kohn, K.W., Wani, M.C., Wall, M.E. & Pommier, Y. (1989). Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for a specific receptor site and a relation to antitumor activity. *Cancer Research*, 49, 1465-1469.
- Jaxel, C., Taudou, G., Portemer, C., Mirambeau, G., Panijel, J. & Duguet, M. (1988). Topoisomerase inhibitors induce irreversible fragmentation of replicated DNA in concanavalin A stimulated splenocytes. *Biochemistry*, 27, 95-99.
- Kamb, A. (1995). Cell-cycle regulators and cancer. *Trends in Genetics*, 11, 136-140.
- Kamens, J., Paskind, M., Hugunin, M., Talanian, R.V., Allen, H., Banach, D., Bump, N., Hackett, M., Johnston, C.G., Li, P., Mankovich, J.A., Terranova, M. & Ghayur, T. (1995). Identification and Characterization Of Ich-2, a Novel Member Of the Interleukin-1-Beta-Converting



- Enzyme Family Of Cysteine Proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 15250-15256.
- Kastan, M.B., onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Craig, R.W. (1991). Participation of p53 protein in cellular response to DNA damage. *Cancer Research*, 51, 6304-6308.
- Kastenm M.M. & Giordano, A. (1998). pRB and the CDKs in apoptosis and the cell cycle. *Cell Death & Differentiation*, 5, 132-140.
- Kaufmann, S.H. (1989). Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Research*, 49, 5870-5878.
- Kaufmann, S.H. (1998). Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs - More questions than answers[Review]. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure & Expression*, 1400, 195-211.
- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. & Poirier, G.G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Research*, 53, 3976-85.
- Kaufmann, W.K. & Paules, R.S. (1996). DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB Journal*, 10, 238-247.
- Kerr, J.F., Gobe, G.C., Winterford, C.M. & Harmon, B.V. (1995). Anatomical methods in cell death. . *Methods in Cell Biology*, 46, 1-27.

- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239-257.
- Kharbanda, S., Pandey, P., Schofield, L., Israels, S., Roncinske, R., Yoshida, K., Bharti, A., Yuan, Z.M., Saxena, S., Weichselbaum, R., Nalin, C. & Kufe, D. (1997). Role For Bcl-X(L) As an Inhibitor Of Cytosolic Cytochrome C Accumulation In Dna Damage-Induced Apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 6939-6942.
- Kim, C.N., Wang, X.D., Huang, Y., Ibrado, A.M., Liu, L., Fang, G.F. & Bhalla, K. (1997). Overexpression Of Bcl-X(L), Inhibits Ara-C-Induced Mitochondrial Loss Of Cytochrome C and Other Perturbations That Activate the Molecular Cascade Of Apoptosis. *Cancer Research*, 57, 3115-3120.
- King, K.L. & Cidlowski, J.A. (1998). Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual Review of Physiology*, 60, 601-617.
- Kluck, R.M., Bossywetzel, E., Green, D.R. & Newmeyer, D.D. (1997a). The Release Of Cytochrome C From Mitochondria - a Primary Site For Bcl-2 Regulation Of Apoptosis. *Science*, 275, 1132-1136.
- Kluck, R.M., Martin, S.J., Hoffman, B.M., Zhou, J.S., Green, D.R. & Newmeyer, D.D. (1997b). Cytochrome C Activation Of Cpp32-Like

Proteolysis Plays a Critical Role In a *Xenopus* Cell-Free Apoptosis System. *EMBO Journal*, 16, 4639-4649.

Knudson, C.M. & Korsmeyer, S.J. (1997). Bcl-2 and Bax Function Independently to Regulate Cell Death. *Nature Genetics*, 16, 358-363.

Knudson, C.M., Tung, K.S.K., Tourtellotte, W.G., Brown, G.A.J. & Korsmeyer, S.J. (1995). Bax-Deficient Mice With Lymphoid Hyperplasia and Male Germ Cell Death. *Science*, 270, 96-99.

Kollmannsberger, C., Mross, K., Jakob, A., Kanz, L. & Bokemeyer, C. (1999). Topotecan- A Novel Topoisomerase I Inhibitor: Pharmacology and Clinical Experience. *Oncology*, 56, 1-12.

Komatsu, N., Oda, T. & Muramatsu, T. (1998). Involvement of Both Caspase-Like Proteases and Serine Proteases in Apoptotic Cell Death Induced By Ricin, Modeccin, Diphtheria Toxin, and Pseudomonas Toxin. *Journal of Biochemistry*, 124, 1038-1044.

Korsmeyer, S.J. (1995). Regulators of cell death. . *Trends in Genetics*, 11, 101-5.

Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K.T., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J. & Williams, L.T. (1997). Caspase-3-Generated Fragment Of Gelsolin - Effector Of Morphological Change In Apoptosis. *Science*, 278, 294-298.

- Krieser, R.J. & Eastman, A. (1998). The Cloning and Expression of Human Deoxyribonuclease Ii - a Possible Role in Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 30909-30914.
- Kroeger, P.E. & Rowe, T.C. (1989). Interaction of topoisomerase I with the transcribed region of the Drosophila HSP 70 heat shock gene. *Nucleic Acids Research*, 17, 8495-8509.
- Kroemer, G., Zamzami, N. & Susin, S.A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today*, 18, 44-51.
- Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S.S., Rakic, P. & Flavell, R.A. (1998). Reduced Apoptosis and Cytochrome C-Mediated Caspase Activation In Mice Lacking Caspase 9. *Cell*, 94, 325-337.
- Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S. & Flavell, R.A. (1995). Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*, 267, 2000-3.
- Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S.Q., Kuan, C.Y., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. & Flavell, R.A. (1996). Decreased Apoptosis In the Brain and Premature Lethality In Cpp32-Deficient Mice. *Nature*, 384, 368-372.
- Kumar, S. & Harvey, N.L. (1995). Role of multiple cellular proteases in the execution of programmed cell death. *FEBS Letters*, 375, 169-173.
- Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N.G. & Jenkins, N.A. (1994). Induction of apoptosis by the mouse nedd2 gene, which encodes a

protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced 3* and the mammalian IL-1 beta converting enzyme. *Genes and Development*, 8, 1613-1626.

Kupfer, G., Bodley, A.L. & Liu, L.F. (1987). Involvement of intracellular ATP in cytotoxicity of topoisomerase II-targetting antitumor drugs. *NCI Monographs*, 4, 37-40.

Lagarkova, M.A., Iarovaia, O.V. & Razin, S.V. (1995). Large-scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomers. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 20239-41.

Lahti, J.M., Xiang, J., Heath, L.S., Campana, D. & Kidd, V.J. (1995). PITSLRE protein kinase activity is associated with apoptosis. *Molecular & Cellular Biology*, 15, 1-11.

Laster, S.M., Wood, J.G. & Gooding, L.R. (1988). Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *Journal of Immunology*, 141, 2629-2634.

Lazebnik, Y.A., Cole, S., Cooke, C.A., Nelson, W.G. & Earnshaw, W.C. (1993). Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 123, 7-22.

- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G. & Earnshaw, W.C. (1994a). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, 371, 346-7.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G. & Earnshaw, W.C. (1994b). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like Ice. *Nature*, 371, 346-347.
- Lazebnik, Y.A., Takahashi, A., Moir, R.D., Goldman, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H. & Earnshaw, W.C. (1995). Studies Of the Lamin Proteinase Reveal Multiple Parallel Biochemical Pathways During Apoptotic Execution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 9042-9046.
- Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kuhnle, S. & Nicotera, P. (1997). Intracellular Adenosine Triphosphate (Atp) Concentration - a Switch In the Decision Between Apoptosis and Necrosis. *Journal of Experimental Medicine*, 185, 1481-1486.
- Lemaire, C., Andreau, K., Souvannavong, V. & Adam, A. (1998). Inhibition Of Caspase Activity Induces a Switch From Apoptosis to Necrosis. *FEBS Letters*, 425, 266-270.
- Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Cascio, W.E., Bradham, C.A., Brenner, D.A. & Herman, B. (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death - A common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy

- [Review]. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1366, 177-196.
- Leonard, C.J., Canman, C.E. & Kastan, M.B. (1995). The role of p53 in cell-cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Important Advances in Oncology*, 33-42.
- Levkau, B., Koyama, H., Raines, E.W., Clurman, B.E., Herren, B., Orth, K., Roberts, J.M. & Ross, R. (1998). Cleavage Of P21(Cip1/Waf1) and P27(Kip1) Mediates Apoptosis In Endothelial Cells Through Activation Of Cdk2 - Role Of a Caspase Cascade. *Molecular Cell*, 1, 553-563.
- Li, H.L., Zhu, H., Xu, C.J. & Yuan, J.Y. (1998). Cleavage Of Bid By Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage In the Fas Pathway Of Apoptosis. *Cell*, 94, 491-501.
- Lippke, J.A., Gu, Y., Sarnecki, C., Caron, P.R. & Su, M.S.S. (1996). Identification and Characterization Of Cpp32/2mch2 Homolog 1, a Novel Cysteine Protease Similar to Cpp32. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 1825-1828.
- Liu, L.F. (1989). DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annual Review of Biochemistry*, 58, 351-375.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J. & Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86, 147-157.

- Liu, X.S., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T. & Wang, X.D. (1998). The 40-Kda Subunit Of Dna Fragmentation Factor Induces Dna Fragmentation and Chromatin Condensation During Apoptosis. *Proceedings Of the National Academy Of Sciences Of the United States Of America*, 95, 8461-8466.
- Liu, X.S., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X.D. (1997). Dff, a Heterodimeric Protein That Functions Downstream Of Caspase-3 to Trigger Dna Fragmentation During Apoptosis. *Cell*, 89, 175-184.
- Lockshin, R.A. & Williams, C.M. (1965). Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal of Insect Physiology*, 11, 803-809.
- Lotem, J. & Sachs, L. (1993). Hematopoietic cells from mice deficient in wild-type p53 are more resistant to induction of apoptosis by some agents. *Blood*, 82, 1092-6.
- Lowe, S.W., Bodis, S., McClatchey, A., Remington, L., Ruley, H.E., Fisher, D.E., Housman, D.E. & Jacks, T. (1994a). p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science*, 266, 807-10.
- Lowe, S.W., Jacks, T., Housman, D.E. & Ruley, H.E. (1994b). Abrogation of oncogene-associated apoptosis allows transformation of p53-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 2026-30.



- Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T. & Housman, D.E. (1993). p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, 74, 957-67.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X.D. (1998). Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome C Release From Mitochondria In Response to Activation Of Cell Surface Death Receptors. *Cell*, 94, 481-490.
- Macfarlane, M., Cain, K., Sun, X.M., Alnemri, E.S. & Cohen, G.M. (1997). Processing/Activation Of At Least Four Interleukin-1-Beta Converting Enzyme-Like Proteases Occurs During the Execution Phase Of Apoptosis In Human Monocytic Tumor Cells. *Journal of Cell Biology*, 137, 469-479.
- Maheswaran, S., Englert, C., Bennett, P., Heinrich, G. & Haber, D.A. (1995). The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes & Development*, 9, 2143-56.
- Marthinuss, J., Andradegordon, P. & Seiberg, M. (1995). A Secreted Serine Protease Can Induce Apoptosis In Pam212 Keratinocytes. *Cell Growth & Differentiation*, 6, 807-816.
- Martin, S.J. & Green, D.R. (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?. *Cell*, 82, 349-52.
- Martin, S.J., O'Brien, G.A., Nishioka, W.K., McGahon, A.J., Mahboubi, A., Saido, T.C. & Green, D.R. (1995). Proteolysis of fodrin (non-erythroid

spectrin) during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 6425-8.

- Martins, L.M., Kottke, T., Mesner, P.W., Basi, G.S., Sinha, S., Frigon, N., Tatar, E., Tung, J.S., Bryant, K., Takahashi, A., Svingen, P.A., Madden, B.J., McCormick, D.J., Earnshaw, W.C. & Kaufmann, S.H. (1997a). Activation Of Multiple Interleukin-1-Beta Converting Enzyme Homologues In Cytosol and Nuclei Of HI-60 Cells During Etoposide-Induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 7421-7430.
- Martins, L.M., Kottke, T.J., Kaufmann, S.H. & Earnshaw, W.C. (1998). Phosphorylated Forms of Activated Caspases Are Present in Cytosol From HI-60 Cells During Etoposide-Induced Apoptosis. *Blood*, 92, 3042-3049.
- Martins, L.M., Mesner, P.W., Kottke, T.J., Basi, G.S., Sinha, S., Tung, J.S., Svingen, P.A., Madden, B.J., Takahashi, A., McCormick, D.J., Earnshaw, W.C. & Kaufmann, S.H. (1997b). Comparison Of Caspase Activation and Subcellular Localization In HI-60 and K562 Cells Undergoing Etoposide-Induced Apoptosis. *Blood*, 90, 4283-4296.
- Marzo, I., Susin, S.A., Petit, P.X., Ravagnan, L., Brenner, C., Larochette, N., Zamzami, N. & Kroemer, G. (1998). Caspases Disrupt Mitochondrial Membrane Barrier Function. *FEBS Letters*, 427, 198-202.

- Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J. & Kato, J.Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Molecular & Cellular Biology*, 14, 2066-2076.
- Matyasova, J., Skalka, M. & Cejkova, M. (1979). Regular character of chromatin degradation in lymphoid tissues after treatment with biological alkylating agents *in vivo*. *Folia Biologica*, 25, 380-388.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. (1997). Flice Is Activated By Association With the Cd95 Death-Inducing Signaling Complex (Disc). *EMBO Journal*, 16, 2794-2804.
- Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwig, E.A. & Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 $\beta$ -converting enzyme, a mammalian homolog of the *c.elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*, 75, 653-660.
- Moallem, S.A. & Hales, B.F. (1995). Induction Of Apoptosis and Cathepsin D In Limbs Exposed In Vitro to an Activated Analog Of Cyclophosphamide. *Teratology*, 52, 3-14.
- Montague, J.W., Gaido, M.L., Frye, C. & Cidlowski, J.A. (1994). A calcium-dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin. Recombinant cyclophilins A, B, and C have nuclease activity. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 18877-80.
- Munday, N.A., Vaillancourt, J.P., Ali, A., Casano, F.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Yamin, T.T., Yu, V.L. & Nicholson, D.W. (1995).

Molecular cloning and pro-apoptotic activity of ICErelII and ICErelIII, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 15870-6.

Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., Orourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. & Dixit, V.M. (1996). Flice, a Novel Fadd-Homologous Ice/Ced-3-Like Protease, Is Recruited to the Cd95 (Fas/Apo-1) Death-Inducing Signaling Complex. *Cell*, 85, 817-827.

Muzio, M., Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1997). Flice Induced Apoptosis In a Cell-Free System - Cleavage Of Caspase Zymogens. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 2952-2956.

Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1998). An Induced Proximity Model For Caspase-8 Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 2926-2930.

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-365.

Nelson, W.G. & Kastan, M.B. (1994). DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Molecular & Cellular Biology*, 14, 1815-23.

Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A. & et al. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease

necessary for mammalian apoptosis [see comments]. *Nature*, 376, 37-43.

Nicholson, D.W. & Thornberry, N.A. (1997). Caspase: killer proteases. *Trends in Biochemical Science*, 22, 299-306.

Nigg, E.A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases - key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays*, 17, 471-480.

Nitiss, J. & Wang, J.C. (1988). DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 7501-7505.

O'Connor, P.M., Ferris, D.K., Hoffmann, I., Jackman, J., Draetta, G. & Kohn, K.W. (1994). Role of the cdc25C phosphatase in G2 arrest induced by nitrogen mustard. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 9480-4.

O'Connor, P.M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T.G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D.A., Monks, A., Sausville, E.A., Weinstein, J.N., Friend, S., Fornace, A.J. & Kohn, K.W. (1997). Characterization of the p53 Tumor Suppressor Pathway in Cell Lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen and Correlations with the Growth-Inhibitory Potency of 123 Anticancer Agents. *Cancer Research*, 57, 4285-4300.

O'Connor, P.M., Kerrigan, D., Bertrand, R., Kohn, K.W. & Pommier, Y. (1990). 10,11-methylenedioxycamptothecin, a topoisomerase I inhibitor of increased potency: DNA damage and correlation to cytotoxicity in

- Human colon carcinoma (HT-29) cells. *Cancer Communications*, 2, 395-400.
- O'Connor, P.M., Nieves-Neira, W., Kerrigan, D., Bertrand, R., Goldman, J., Kohn, K.W. & Pommier, Y. (1991). S-Phase population analysis does not correlate with the cytotoxicity of camptothecin and 10,11-methylenedioxycamptothecin in human colon carcinoma HT-29 cells. *Cancer Communications*, 3, 233-240.
- Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.A., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R. & Sikorska, M. (1993a). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO Journal*, 12, 3679-3684.
- Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R. & Sikorska, M. (1993b). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO Journal*, 12, 3679-84.
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L. & Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74, 609-19.
- Oren, M. (1997). Lonely no more: p73 finds its kin in a tumor suppressor haven. *Cell*, 90, 829-832.

- Orth, K., O'Rourke, K., Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1996). Molecular Ordering Of Apoptotic Mammalian Ced-3/Ice-Like Proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 20977-20980.
- Ostrander, E.A., Benedetti, P. & Wang, J.C. (1990). Template supercoiling by a chimera of yeast GAL4 protein and phage T7 RNA polymerase. *Science*, 249, 1261-1265.
- Pandey, S., Walker, P.R. & Sikorska, M. (1994). Separate pools of endonuclease activity are responsible for internucleosomal and high molecular mass DNA fragmentation during apoptosis. *Biochemistry & Cell Biology*, 72, 625-9.
- Pandey, S., Walker, P.R. & Sikorska, M. (1997). Identification Of a Novel 97 Kda Endonuclease Capable Of Internucleosomal Dna Cleavage. *Biochemistry*, 36, 711-720.
- Patel, T., Gores, G.J. & Kaufmann, S.H. (1996). The role of proteases during apoptosis. *FASEB Journal*, 10, 587-597.
- Peitsch, M.C., Muller, C., Tschopp, J. (1993). DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts. *Nucleic Acids Research*, 21, 4206-4209.
- Perkins, C., Kim, C.N., Fang, G.F. & Bhalla, K.N. (1998). Overexpression of Apaf-1 Promotes Apoptosis of Untreated and Paclitaxel- or Etoposide-Treated HI-60 Cells. *Cancer Research*, 58, 4561-4566.

- Petit, P.X., Goubern, M., Diolez, P., Susin, S.A., Zamzami, N. & Kroemer, G. (1998). Disruption Of the Outer Mitochondrial Membrane As a Result Of Large Amplitude Swelling - the Impact Of Irreversible Permeability Transition. *FEBS Letters*, 426, 111-116.
- Phillips, J.W. & Morgan, W.F. (1994). Illegitimate recombination induced by DNA double strand breaks in a mammalian chromosome. *Molecular & Cellular Biology*, 14, 5794-5803.
- Polyak, K., Kato, J., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massagué, J., Roberts, J.M. & Koff, A. (1994). p27Kip, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitotic signals. *Cell*, 78, 59-66.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1997). A Model For P53-Induced Apoptosis. *Nature*, 389, 300-305.
- Pommier, Y., Kerrigan, D. & Kohn, K.W. (1987). Topoisomerase alterations associated with drug resistance in a line of chinese Hamster cells. *NCI Monographs*, 47, 83-87.
- Pommier, Y. & Kohn, K.W. (1989). Topoisomerase II inhibition by antitumor intercalators and demethylepipodophyllotoxins. In *Developments in Cancer Chemotherapy*, Gazer, R.I. (ed), Vol. 2. pp. 175-196. CRC Press, Inc.: Boca Raton, FA.
- Pommier, Y., Leteurtre, F., Fesen, M.R., Fujimori, A., Bertrand, R., Solary, E., Kohlhagen, G. & Kohn, K.W. (1994). Cellular determinants of



- sensitivity and resistance to DNA topoisomerase inhibitors. *Cancer Investigation*, 12, 530-42.
- Pommier, Y., Pourquier, P., Strumberg, D., Takebayashi, Y., Shao, R.-G. & Kohlhaagen, G. (1999). Multiple mechanisms for activation of topoisomerase-mediated DNA damage. *Proceedings of The American Association for Cancer Research*, 40, 773-774.
- Pommier, Y. & Tanizawa, A. (1993). Mammalian DNA topoisomerase I and its inhibitors. In *Cancer Chemotherapy*, Hickman, J. & Tritton, T. (eds) pp. 214-250. Blackwell Scientific Publications LTD: Oxford.
- Quan, L., Caputo, A., Bleackley, R., Pickup, D. & Salvesen, C. (1995). Granzyme B is inhibited by the cowpox virus serpin cytokine response modifier. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 10377-10379.
- Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y. & Jacobson, M.D. (1994). Programmed cell death and the control of cell survival. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 345, 265-8.
- Rao, L., Perez, D. & White, E. (1996). Lamin Proteolysis Facilitates Nuclear Events During Apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 135, 1441-1455.
- Ray, C.A., Black, R.A., Kronheim, S.R., Greenstreet, T.A., Sleath, P.R., Salvesen, G.S. & Pickup, D.J. (1992). Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell*, 69, 597-604.

- Reed, J.C. (1994). Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *Journal of Cell Biology*, 124, 1-6.
- Reed, J.C. (1995). Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematology - Oncology Clinics of North America*, 9, 451-73.
- Reed, J.C. (1997). Double Identity For Proteins Of the Bcl-2 Family. *Nature*, 387, 773-776.
- Rose, K.M., Szopa, J., Han, F.S., Cheng, Y.C., Richter, A. & Scheer, U. (1988). Association of DNA topoisomerase I and RNA polymerase I: a possible role for topoisomerase I in ribosomal gene transcription. *Chromosoma*, 96, 411-416.
- Rothe, M., Pan, M.G., Henzel, W.J., Ayres, T.M. & Goeddel, D.V. (1995). The Tnfr2-Traf Signaling Complex Contains Two Novel Proteins Related to Baculoviral-Inhibitor Of Apoptosis Proteins. *Cell*, 83, 1243-1252.
- Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. & Reed, J.C. (1997). The C-Iap-1 and C-Iap-2 Proteins Are Direct Inhibitors Of Specific Caspases. *EMBO Journal*, 16, 6914-6925.
- Rusnak, J.M., Calmels, T.P.G., Hoyt, D.G., Kondo, Y., Yalowich, J.C. & Lazo, J.S. (1996). Genesis Of Discrete Higher Order Dna Fragments In Apoptotic Human Prostatic Carcinoma Cells. *Molecular Pharmacology*, 49, 244-252.
- Russell, J.H., Masakovski, V.R. & Dobos, C.B. (1980). Mechanisms of immune lysis. I. Physiological distinction between target cell death mediated by

- cytotoxic T lymphocytes and antibody plus complement. *Journal of Immunology*, 124, 1100-1105.
- Ryan, A.J., Squires, S., Strutt, H.L. & Johnson, R.T. (1991). Camptothecin cytotoxicity in mammalian cells is associated with the induction of persistent double strand breaks in replicating DNA. *Nucleic Acids Research*, 19, 3295-3300.
- Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. (1998). Cleavage Of Cad Inhibitor In Cad Activation and Dna Degradation During Apoptosis. *Nature*, 391, 96-99.
- Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1997). Caspases - Intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 91, 443-446.
- Samejima, K. & Earnshaw, W.C. (1998). Icad/Dff Regulator of Apoptotic Nuclease Is Nuclear. *Experimental Cell Research*, 243, 453-459.
- Sanchez, Y. & Elledge, S.J. (1995). Stopped For Repairs. *Bioessays*, 17, 545-548.
- Sané, A.T. & Bertrand, R. (1998). Distinct steps in DNA fragmentation pathway during camptothecin-induced apoptosis involved caspase-, benzyloxycarbonyl- and N-tosyl-L-phenylalanylchloromethyl ketone-sensitive activities. *Cancer Research*, 58, 3066-3072.
- Sané, A.T. & Bertrand, R. (1999). Caspase inhibition in camptothecin-treated U-937 cells is coupled with a shift from apoptosis to transient G<sub>1</sub> arrest followed by necrotic cell death ( in press). *Cancer Research*, 59

- Sané, A.T., Schmitt, E., Steyaert, A., Meyer, D. & Bertrand, R. (1997). The CrmA- and TPCK-sensitive pathways that trigger oligonucleosome-sized DNA fragmentation in camptothecin-induced apoptosis: relation to caspase activation and high molecular weight DNA fragmentation. *Biochemistry & Cell Biology*, 75, 359-358.
- Savill, J. (1992). Macrophage recognition of senescent neutrophils. *Clinical Science*, 83, 649-55.
- Savill, J. (1998). Apoptosis - Phagocytic Docking Without Shocking. *Nature*, 392, 442-443.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P. & Haslett, C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology Today*, 14, 131-136.
- Savill, J. & Haslett, C. (1995). Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Seminars in Cell Biology*, 6, 385-393.
- Savill, J.S., Wyllie, A.H., Henson, J.E., Walport, M.J., Henson, P.M. & Haslett, C. (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 83, 865-875.
- Scarlett, J.L. & Murphy, M.P. (1997). Release Of Apoptogenic Proteins From the Mitochondrial Intermembrane Space During the Mitochondrial Permeability Transition. *FEBS Letters*, 418, 282-286.

- Schlegel, J., Peters, I. & Orrenius, S. (1995). Isolation and partial characterization of a protease involved in Fas-induced apoptosis. *FEBS Letters*, 364, 139-42.
- Schmitt, E., Cimoli, G., Steyaert, A. & Bertrand, R. (1998a). Bcl-xL modulates apoptosis induced by anticancer drugs and delays DEVDase and DNA fragmentation-promoting activities. *Experimental Cell Research*, 240, 107-121.
- Schmitt, E., Steyaert, A., Cimoli, G. & Bertrand, R. (1998b). Bax-alpha promotes apoptosis induced by cancer chemotherapy and accelerates the activation of caspase 3-like cysteine proteases in p53 double mutant B lymphoma Namalwa cells. *Cell Death & Differentiation*, 5, 506-516.
- Schneider, E., Hsiang, Y.-H. & Liu, L.F. (1990). DNA topoisomerases as anticancer drug targets. *Advances in Pharmacology*, 21, 149-183.
- Schott, A.F., Apel, I.J., Nunez, G. & Clarke, M.F. (1995). Bcl-X(L) Protects Cancer Cells From P53-Mediated Apoptosis. *Oncogene*, 11, 1389-1394.
- Selvakumaran, M., Lin, H., Miyashita, T., Wang, H., Krajewski, S., Reed, J., Hoffman, B. & Liebermann, D. (1994). Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGFb1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene*, 9, 1791-1798.
- Sherr, C.J. (1996). Cancer Cell Cycles. *Science*, 274, 1672-1677.
- Sherr, C.J. & Roberts, J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Development*, 9, 1149-1163.

- Shi, L.F., Chen, G., Macdonald, G., Bergeron, L., Li, H.L., Miura, M., Rotello, R.J., Miller, D.K., Li, P., Seshadri, T., Yuan, J.Y. & Greenberg, A.H. (1996). Activation Of an Interleukin 1 Converting Enzyme-Dependent Apoptosis Pathway By Granzyme B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 11002-11007.
- Shibata, M., Kanamori, S., Isahara, K., Ohsawa, Y., Konishi, A., Kametaka, S., Watanabe, T., Ebisu, S., Ishido, K., Kominami, E. & Uchiyama, Y. (1998). Participation of Cathepsins B and D in Apoptosis of Pc12 Cells Following Serum Deprivation. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 251, 199-203.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Matsuda, H. & Tsujimoto, Y. (1996). Bcl-2 Expression Prevents Activation Of the Ice Protease Cascade. *Oncogene*, 12, 2251-2257.
- Shimizu, T. & Pommier, Y. (1996). Dna Fragmentation Induced By Protease Activation In P53-Null Human Leukemia HI60 Cells Undergoing Apoptosis Following Treatment With the Topoisomerase I Inhibitor Camptothecin - Cell-Free System Studies. *Experimental Cell Research*, 226, 292-301.
- Shimizu, T. & Pommier, Y. (1997). Camptothecin-Induced Apoptosis In P53-Null Human Leukemia HI60 Cells and Their Isolated Nuclei - Effects Of the Protease Inhibitors Z-Vad-Fmk and Dichloroisocoumarin

Suggest an Involvement Of Both Caspases and Serine Proteases.  
*Leukemia*, 11, 1238-1244.

Shin, C.-G. & Snapka, R.M. (1990a). Exposure to camptothecin breaks leading and lagging strand simian virus 40 DNA replication forks. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 168, 135-140.

Shin, C.-G. & Snapka, R.M. (1990b). Patterns of strongly protein-associated simian virus 40 DNA replication intermediates resulting from exposures to specific topoisomerase poisons. *Biochemistry*, 29, 10934-10939.

Simonian, P.L., Grillot, D.A.M. & Nunez, G. (1997). Bcl-2 and Bcl-Xl Can Differentially Block Chemotherapy-Induced Cell Death. *Blood*, 90, 1208-1216.

Skulachev, V.P. (1996). Why Are Mitochondria Involved In Apoptosis - Permeability Transition Pores and Apoptosis As Selective Mechanisms to Eliminate Superoxide-Producing Mitochondria and Cell. *FEBS Letters*, 397, 7-10.

Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R. & Martin, S.J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *Journal of Cell Biology*, 144, 281-292.

- Slichenmyer, W.J., Rowinsky, E.K., Donehower, R.C. & Kaufmann, S.H. (1993). The current status of camptothecin analogs as anticancer agents. *Journal of the National Cancer Institute*, 85, 271-287.
- Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C.Y., Gilmer, T.M., Kastan, M.B., O'Connor, P.M. & Fornace, A.J., Jr. (1994). Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen [see comments]. *Science*, 266, 1376-80.
- Solary, E., Bertrand, R., Jenkins, J. & Pommier, Y. (1993a). Radiolabeling of DNA can induce its fragmentation in HL-60 promyelocytic leukemic cells. *Experimental Cell Research*, 203, 495-498.
- Solary, E., Bertrand, R., Kohn, K.W. & Pommier, Y. (1993b). Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Blood*, 81, 1359-68.
- Solary, E., Bertrand, R. & Pommier, Y. (1994). Apoptosis induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors in human leukemic HL-60 cells. *Leukemia & Lymphoma*, 15, 21-32.
- Solary, E., Dubrez, L., Eymin, B., Bertrand, R. & Pommier, Y. (1996). Apoptosis induction in human leukemic cells by topoisomerase I and II inhibitors. *Bulletin du Cancer*, 83, 205-212.
- Song, Q.Z., Leesmiller, S.P., Kumar, S., Zhang, N., Chan, D.W., Smith, G.C.M., Jackson, S.P., Alnemri, E.S., Litwack, G., Khanna, K.K. & Lavin, M.F. (1996). Dna-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit -



- a Target For an Ice-Like Protease In Apoptosis. *EMBO Journal*, 15, 3238-3246.
- Spaner, D. (1998). A Role for Perforin in Activation-Induced Cell Death. *The Journal of Immunology*, 160, 2655-2664.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandesalnemri, T. & Alnemri, E.S. (1998). Autoactivation Of Procaspase-9 By Apaf-1-Mediated Oligomerization. *Molecular Cell*, 1, 949-957.
- Steevens, M., Goossens, V., Van de Craen, M., Van Herreweghe, F., Vancompernelle, K., De Vos, K., Vandenabeele, P. & Grooten, J. (1999). A Caspase-activated Factor (CAF) Induces Mitochondrial Membrane Depolarization and Cytochrome c Release by a Nonproteolytic Mechanism. *Journal of Experimental Medicine*, 188, 2193-2198.
- Stennicke, H.R. & Salvesan, G.S. (1997). Biochemical Characteristics Of Caspases-3, -6, -7, and -8. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 25719-25723.
- Stennicke, H.R. & Salvesen, G.S. (1998). Properties of the Caspases[Review]. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure & Molecular Enzymology*, 1387, 17-31.
- Stewart, A.F., Herrera, R.E. & Nordheim, A. (1990). Rapid induction of c-fos transcription reveals quantitative linkage of RNA polymerase II and DNA topoisomerase I enzyme activities. *Cell.*, 60, 141-146.

- Stewart, A.F. & Schutz, G. (1987). Camptothecin-induced in vivo topoisomerase I cleavages in the transcriptionally active tyrosine aminotransferase gene. *Cell*, 50, 1109-1117.
- Stewart, L., Redinbo, M.R., Qiu, X., Hol, W.G.J. & Champoux, J.J. (1998). A Model for the Mechanism of Human Topoisomerase I. *Science*, 279, 1534-1541.
- Strasser, A., Harris, A.W., Jacks, T. & Cory, S. (1994). DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2 [see comments]. *Cell*, 79, 329-39.
- Su, X., Zhou, T., Wang, Z., Yang, P., Jope, R.S. & Mountz, J.D. (1995). Defective expression of hematopoietic cell protein tyrosine phosphatase (HCP) in lymphoid cells blocks Fas-mediated apoptosis. *Immunity*, 2, 353-62.
- Sugimoto, A., Friesen, P.D. & Rothman, J.H. (1994). Baculovirus p35 prevents developmentally programmed cell death and rescues a ced-9 mutant in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Journal*, 13, 2023-8.
- Sulston, J.E. (1976). Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society. London Series B: Biological Sciences*, 275, 287-297.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prévost, M.-C., Alzari, P.M. & Kroemer, G. (1999a). Mitochondrial

- Release of Caspase-2 and -9 during the Apoptotic Process. *Journal of Experimental Medicine*, 189, 381-393.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. & Kroemer, G. (1999b). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397, 441-445.
- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H.G., Geley, S., Fassy, F., Reed, J.C. & Kroemer, G. (1997). The Central Executioner Of Apoptosis - Multiple Connections Between Protease Activation and Mitochondria In Fas/Apo-1/Cd95- and Ceramide-Induced Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 186, 25-37.
- Susin, S.A., Zamzami, N. & Kroemer, G. (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis - doubt no more[Review]. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1366, 151-165.
- Suzuki, A., Iwasaki, M. & Wagai, N. (1997). Involvement Of Cytoplasmic Serine Proteinase and Cpp32 Subfamily In the Molecular Machinery Of Caspase 3 Activation During Fas-Mediated Apoptosis. *Experimental Cell Research*, 233, 48-55.
- Svejstrup, J.Q., Christiansen, K., Gromova, I.I., Andersen, A.H. & Westergaard, O. (1991). New technique for uncoupling the cleavage and religation reactions of eukaryotic topoisomerase I. The mode of action

of camptothecin at a specific recognition site. *Journal of Molecular Biology*, 222, 669-678.

Takahashi, A., Hirata, H., Yonehara, S., Imai, Y., Lee, K.K., Moyer, R.W., Turner, P.C., Mesner, P.W., Okazaki, T., Sawai, H., Kishi, S., Yamamoto, K., Okuma, M. & Sasada, M. (1997). Affinity Labeling Displays the Stepwise Activation Of Ice-Related Proteases By Fas, Staurosporine, and Crma-Sensitive Caspase-8. *Oncogene*, 14, 2741-2752.

Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D.A., Vigna, N., Oltersdorf, T. & Reed, J.C. (1998). IAP-Family Protein Survivin Inhibits Caspase Activity and Apoptosis Induced by Fas (CD95), Bax, Caspases, and Anticancer Drugs. *Cancer Research*, 58, 5315-5320.

Tamura, T., Ishihara, M., Lamphier, M.S., Tanaka, N., Oishi, I., Aizawa, S., Matsuyama, T., Mak, T.W., Taki, S. & Taniguchi, T. (1995). An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes. *Nature*, 376, 596-9.

Tanaka, N., Ishihara, M., Lamphier, M.S., Nozawa, H., Matsuyama, T., Mak, T.W., Aizawa, S., Tokino, T., Oren, M. & Taniguchi, T. (1996). Cooperation Of the Tumour Suppressors Irf-1 and P53 In Response to Dna Damage. *Nature*, 382, 816-818.

- Tang, D.G., Li, L., Zhu, Z.Y. & Joshi, B. (1998). Apoptosis In the Absence Of Cytochrome C Accumulation In the Cytosol. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 242, 380-384.
- Tanizawa, A., Bertrand, R., Tabuchi, A., Jenkins, J. & Pommier, Y. (1993). Cloning of Chinese Hamster DNA topoisomerase I cDNA and identification of a single point mutation responsible for camptothecin resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 25463-25468.
- Terada, Y., Tatsuka, M., Jino, S. & Okayama, H. (1995). Requirement for tyrosine phosphorylation of Cdk4 in G1 arrest induced by ultraviolet irradiation. *Nature*, 376, 358-362.
- Tewari, M. & Dixit, V.M. (1995). Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 3255-60.
- Tewari, M., Quan, L.T., Orourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1995). Yama/Cpp32-Beta, a Mammalian Homolog Of Ced-3, Is a Crma-Inhibitable Protease That Cleaves the Death Substrate Poly(Adp-Ribose) Polymerase. *Cell*, 81, 801-809.
- Thomas, A., Elrouby, S., Reed, J.C., Krajewski, S., Silber, R., Potmesil, M. & Newcomb, E.W. (1996). Drug-Induced Apoptosis In B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia - Relationship Between P53 Gene Mutation and Bcl-2/Bax Proteins In Drug Resistance. *Oncogene*, 12, 1055-1062.

- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-62.
- Thornberry, N.A. (1998). Caspases - Key Mediators Of Apoptosis. *Chemistry & Biology*, 5, R 97-R 103.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R. & al., e. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356, 768-774.
- Thornberry, N.A. & Molineaux, S.M. (1995). Interleukin-1 beta converting enzyme: a novel cysteine protease required for IL-1 beta production and implicated in programmed cell death. . *Protein Science*, 4, 3-12.
- Thornberry, N.A., Ranon, T.A., Pieterston, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garciacalvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T. & Nicholson, D.W. (1997). A Combinatorial Approach Defines Specificities Of Members Of the Caspase Family and Granzyme B - Functional, Relationships Established For Key Mediators Of Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 17907-17911.
- Thrash, C., Voelkel, K., DiNardo, S. & Sternglanz, R. (1984). Identification of *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in DNA topoisomerase I activity. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 1375-1377.

- Toh, S.Y., Wang, X.D. & Li, P. (1998). Identification of the Nuclear Factor Hmg2 As an Activator For Dff Nuclease Activity. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 250, 598-601.
- Tomei, L.D., Shapiro, J.P. & Cope, F.O. (1993). Apoptosis in C3H/10T1/2 mouse embryonic cells: evidence for internucleosomal DNA modification in the absence of double-strand cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 853-7.
- Torriglia, A., Perani, P., Brossas, J.Y., Chaudun, E., Treton, J., Courtois, Y. & Counis, M.F. (1998). L-Dnase II, a Molecule That Links Proteases and Endonucleases In Apoptosis, Derives From the Ubiquitous Serpin Leukocyte Elastase Inhibitor. *Molecular & Cellular Biology*, 18, 3612-3619.
- Tsujimoto, Y. (1989). Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 alpha protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene*, 4, 1331-1336.
- Ucker, D.S., Obermiller, P.S., Eckhart, W., Apgar, J.R., Berger, N.A. & Meyers, J. (1992). Genome digestion is a dispensable consequence of physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Molecular and cellular Biology*, 12, 3060-3069.
- Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K.B.,

- Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P. & Wallach, D. (1998). Targeted Disruption Of the Mouse Caspase 8 Gene Ablates Cell Death Induction By the Tnf Receptors, Fas/Apo1, and Dr3 and Is Lethal Prenatally. *Immunity*, 9, 267-276.
- Vaux, D.L., Cory, S. & Adaams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335, 440-442.
- Vaux, D.L., Haecker, G. & Strasser, A. (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*, 76, 777-9.
- Vaux, D.L., Weissman, I.L. & Kim, S.K. (1992). Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science*, 258, 1955-1957.
- Villa, P., Kaufmann, S.H. & Earnshaw, W.C. (1997). Caspases and Caspase Inhibitors. *Trends in Biochemical Sciences*, 22, 388-393.
- Vincenz, C. & Dixit, V.M. (1997). Fas-Associated-Death Domain Protein Interleukin-1-Beta-Converting Enzyme 2 (Flice2), an Ice/Ced-3 Homologue, Is Proximally Involved In Cd95- and P55-Mediated Death Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 6578-6583.
- Voelkel-Johnson, C., Entingh, A.J., Wold, W.S., Gooding, L.R. & Laster, S.M. (1995). Activation of intracellular proteases is an early event in TNF-induced apoptosis. *Journal of Immunology*, 154, 1707-16.



- Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1996).  
Uncoupling Of S Phase and Mitosis Induced By Anticancer Agents In  
Cells Lacking P21. *Nature*, 381, 713-716.
- Walker, P.R., Leblanc, J. & Sikorska, M. (1997). Evidence that DNA  
fragmentation in apoptosis is initiated and propagated by single-strand  
breaks. *Cell Death & Differentiation*, 4, 506-515.
- Walker, P.R. & Sikorska, M. (1994). Endonuclease activities, chromatin  
structure, and DNA degradation in apoptosis. . *Biochemistry & Cell  
Biology*, 72, 615-23.
- Walker, P.R., Smith, C., Youdale, T., Leblanc, J., Whitfield, J.F. & Sikorska,  
M. (1991). Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce  
apoptosis in thymocytes. *Cancer Research*, 51, 1078-1085.
- Walker, P.R., Weaver, V.M., Lach, B., LeBlanc, J. & Sikorska, M. (1994).  
Endonuclease activities associated with high molecular weight and  
internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Experimental Cell  
Research*, 213, 100-6.
- Wang, J.C. (1987). Recent studies of DNA topoisomerases. *Biochimica et  
Biophysica Acta*, 909, 1-9.
- Wang, J.C. (1991). DNA topoisomerases: why so many? *Journal of Biological  
Chemistry*, 266, 6659-6662.

- Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H. & Yuan, J. (1994). Ich-1, an Ice/ced3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell*, 78, 739-750.
- Wang, S.Y., Miura, M., Jung, Y.K., Zhu, H., Gagliardini, V., Shi, L.F., Greenberg, A.H. & Yuan, J.Y. (1996). Identification and Characterization Of Ich-3, a Member Of the Interleukin-1-Beta Converting Enzyme (Ice)/Ced-3 Family and an Upstream Regulator Of Ice. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 20580-20587.
- Wang, Z.Q., Stingl, L., Morrison, C., Jantsch, M., Los, M., Schulzeosthoff, K. & Wagner, E.F. (1997). Parp Is Important For Genomic Stability But Dispensable In Apoptosis. *Genes & Development*, 11, 2347-2358.
- Weaver, V.M., Lach, B., Walker, P.R. & Sikorska, M. (1993). Role of proteolysis in apoptosis: involvement of serine proteases in internucleosomal DNA fragmentation in immature thymocytes. *Biochemistry & Cell Biology*, 71, 488-500.
- Wertz, I.E. & Hanley, M.R. (1996). Diverse Molecular Provocation Of Programmed Cell Death. *Trends in Biochemical Sciences*, 21, 359-364.
- White, E. (1994). Tumour biology. p53, guardian of Rb [news; comment]. *Nature*, 371, 21-2.
- Whyte, M. (1996). Ice/Ced-3 Proteases In Apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 6, 245-248.

- Williams, M.S. & Henkart, P.A. (1994). Apoptotic cell death induced by intracellular proteolysis. *Journal of Immunology*, 153, 4247-55.
- Wood, K.A. & Youle, R.J. (1995). The role of free radicals and p53 in neuron apoptosis in vivo. *Journal of Neuroscience*, 15, 5851-7.
- Wright, S.C., Schellenberger, U., Wang, H., Wang, Y.Q. & Kinder, D.H. (1998). Chemotherapeutic Drug Activation Of the Ap24 Protease In Apoptosis - Requirement For Caspase 3-Like-Proteases. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 245, 797-803.
- Wright, S.C., Wei, Q.S., Zhong, J., Zheng, H., Kinder, D.H. & Larrick, J.W. (1994). Purification of a 24-kD protease from apoptotic tumor cells that activates DNA fragmentation. *Journal of Experimental Medicine*, 180, 2113-23.
- Wu, H.Y., Shyy, S.H., Wang, J.C. & Liu, L.F. (1988). Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell.*, 53, 433-440.
- Wyllie, A. (1998). Apoptosis - an Endonuclease At Last. *Nature*, 391, 20-21.
- Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.*, 284, 555-556.
- Wyllie, A.H. (1987). Apoptosis: cell death in tissue regulation. *Journal of Pathology*, 153, 313-316.

- Wyllie, A.H. (1992). Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. . *Cancer & Metastasis Reviews*, 11, 95-103.
- Wyllie, A.H. (1997). Apoptosis: an overview. *British Medical Bulletin*, 53, 451-465.
- Wyllie, A.H., Beattie, G.J. & Hargreaves, A.D. (1981). Chromatin changes in apoptosis. *Histochemistry Journal*, 13, 681-692.
- Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L. & Dunlop, D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *Journal of Pathology*, 142, 67-77.
- Xue, D. & Horvitz, H.R. (1995). Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature*, 377, 248-51.
- Yang, J., Liu, X.S., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J.Y., Peng, T.I., Jones, D.P. & Wang, X.D. (1997). Prevention Of Apoptosis By Bcl-2 - Release Of Cytochrome C From Mitochondria Blocked. *Science*, 275, 1129-1132.
- Yang, J.J., Kettritz, R., Falk, R.J., Jennette, J.C. & Gaido, M.L. (1996). Apoptosis Of Endothelial Cells Induced By the Neutrophil Serine Proteases Proteinase 3 and Elastase. *American Journal of Pathology*, 149, 1617-1626.

- Yang, L., Wold, M.S., Li, J.J., Kelly, T.J. & Liu, L.F. (1987). Roles of DNA topoisomerases in simian virus 40 DNA replication in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 950-954.
- Yoshida, A., Pourquier, P. & Pommier, Y. (1998a). Purification and Characterization Of a Mg<sup>2+</sup>-Dependent Endonuclease (An34) From Etoposide-Treated Human Leukemia HI-60 Cells Undergoing Apoptosis. *Cancer Research*, 58, 2576-2582.
- Yoshida, A., Takauji, R., Inuzuka, M., Ueda, T. & Nakamura, T. (1996). Role Of Serine and Ice-Like Proteases In Induction Of Apoptosis By Etoposide In Human Leukemia HI-60 Cells. *Leukemia*, 10, 821-824.
- Yoshida, H., Kong, Y.Y., Yoshida, R., Elia, A.J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J.M. & Mak, T.W. (1998b). Apaf1 Is Required For Mitochondrial Pathways Of Apoptosis and Brain Development. *Cell*, 94, 739-750.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., Horvitz, R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukine-1B-converting enzyme. *Cell*, 75, 641-652.
- Yuan, J. & Horvitz, H.R. (1992). The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development*, 116, 309-320.

- Zamzami, N., Hirsch, T., Dallaporta, B., Petit, P.X. & Kroemer, G. (1997). Mitochondrial Implication In Accidental and Programmed Cell Death - Apoptosis and Necrosis. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*, 29, 185-193.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B. & Kroemer, G. (1995a). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *Journal of Experimental Medicine*, 182, 367-77.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L., Petit, P.X. & Kroemer, G. (1995b). Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 181, 1661-72.
- Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M. & Kroemer, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 183, 1533-1544.
- Zhang, J.H., Liu, X.S., Scherer, D.C., Vankaer, L., Wang, X.D. & Xu, M. (1998). Resistance to Dna Fragmentation and Chromatin Condensation in Mice Lacking the Dna Fragmentation Factor 45. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 12480-12485.

- Zhang, H., Wang, J. C., Liu, L. F. Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes (1988). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 1065-1064.
- Zheng, T.S., Schlosser, S.F., Dao, T., Hingorani, R., Crispe, I.N., Boyer, J.L. & Flavell, R.A. (1998). Caspase-3 Controls Both Cytoplasmic and Nuclear Events Associated With Fas-Mediated Apoptosis in Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 13618-13623.
- Zhou, Q. & Salvesen, G.S. (1997). Activation Of Pro-Caspase-7 By Serine Proteases Includes a Non-Canonical Specificity. *Biochemical Journal*, 324, 361-364.
- Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V.M. & Salvesen, G.S. (1997). Target Protease Specificity Of the Viral Serpin Crma - Analysis Of Five Caspases. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 7797-7800.
- Zhu, H., Dinsdale, D., Alnemri, E.S. & Cohen, G.M. (1997). Apoptosis in human monocytic THP.1 cells involves several distinct targets of N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone. *Cell Death & Differentiation*, 4, 590-599.
- Zhu, H.J., Fearnhead, H.O. & Cohen, G.M. (1995). An Ice-Like Protease Is a Common Mediator Of Apoptosis Induced By Diverse Stimuli In Human Monocytic Thp.1 Cells. *FEBS Letters*, 374, 303-308.

- Ziegler, A., Jonason, A.S., Leffell, D.J., Simon, J.A., Sharma, H.W., Kimmelman, J., Remington, L., Jacks, T. & Brash, D.E. (1994). Sunburn and p53 in the onset of skin cancer [see comments]. *Nature*, 372, 773-6.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X.S., Lutschg, A. & Wang, X.D. (1997). Apaf-1, a Human Protein Homologous to C-Elegans Ced-4, Participates In Cytochrome C-Dependent Activation Of Caspase-3. *Cell*, 90, 405-413.