Identification des caspases impliquées dans l'apoptose des cellules leucémiques humaines: rôle et fonction des isoformes de la caspase-2.

par

Nathalie Droin

Thèse de doctorat effectuée en cotutelle

à

l'INSERM unité 517

U.F.R. de Médecine

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

ET

Centre de Recherche du C.H.U.M.

Institut du Cancer de Montréal

UNIVERSITE DE MONTREAL

Thèse présentée à l'U.F.R. de Médecine de l'Université de Bourgogne

en vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Mention: Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

et à

la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal

en vue de l'obtention du grade de

PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.)

Programme de Biologie Moléculaire

août, 2000

© **Nathalie Droin, 2000**

QH
506
U54
2000
v. 007

SOMMAIRE

Le traitement de première ligne des leucémies aiguës myéloblastiques (maladie définie par la présence, dans la moelle osseuse hématopoïétique, de cellules blastiques représentant plus de 30% des cellules médullaires) associe classiquement l'aracytine à un inhibiteur de la topoisomérase II, en particulier une anthracycline. Ce traitement permet d'obtenir une rémission complète (définie par la réduction de la blastose médullaire en dessous de 5% et la normalisation de l'hémogramme) chez 70 à 85 % des patients en fonction des doses utilisées et de l'âge des patients. Cette réponse doit être confortée par une ou plusieurs séquences de chimiothérapie (éventuellement complétées par une autogreffe ou une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques) afin d'éliminer les cellules leucémiques résiduelles. Une résistance initiale au traitement est observée chez 15 à 30 % des patients (leucémie aiguë réfractaire) tandis qu'une rechute survient dans un délai de quelques semaines à plusieurs années chez une partie des patients initialement en réponse complète. Ces évènements traduisent une résistance au traitement cytotoxique, responsable de la mort de 60 à près de 100% des patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique en fonction des facteurs pronostiques. Les principaux facteurs pronostiques identifiés sont l'âge avancé, certaines anomalies cytogénétiques et la leucocytose initiale élevée.

La résistance d'une fraction des cellules leucémiques au traitement cytotoxique fait intervenir divers mécanismes parmi lesquels un défaut d'accumulation des médicaments anticancéreux dans les cellules blastiques, par exemple du fait d'une augmentation de leur efflux par un mécanisme dépendant de l'ATP (phénotype de résistance multiple aux agents cytotoxiques impliquant la glycoprotéine P en particulier), de l'altération du métabolisme intracellulaire de l'agent cytotoxique (principalement l'aracytine) ou de la modification de sa cible intracellulaire (réduction de la quantité de topoisomérase II ou mutation de l'enzyme par exemple). L'identification de ces mécanismes de résistance a conduit à mettre au point des stratégies de réversion, en particulier l'utilisation d'inhibiteurs compétitifs de la glycoprotéine P. Cependant, jusqu'à maintenant, ces

stratégies se sont révélées décevantes en clinique humaine, à l'exception, peut être, des leucémies aiguës myéloblastiques issues de la transformation des syndromes myélodysplasiques primitifs.

Il semble que la mort cellulaire par apoptose soit la principale forme de mort induite dans les leucémies par les agents cytotoxiques. On observe, dans le sang de sujets atteints de leucémie aiguë et recevant un traitement cytotoxique, des cellules blastiques ayant un phénotype apoptotique. La mort par apoptose implique l'activation séquentielle d'un certain nombre d'évènements moléculaires (modifications mitochondriales, activation de caspases, clivage de protéines intracellulaires et de l'ADN). L'activation de ces évènements semble la conséquence des lésions spécifiquement induites par l'agent cytotoxique au niveau de sa cible cellulaire (par exemple, les altérations de l'ADN nucléaire induites par un inhibiteur de la topoisomérase II). A côté de ces lésions spécifiques, les agents cytotoxiques sont capables d'activer plusieurs voies de signalisation intracellulaires dont certaines favorisent la mort cellulaire par apoptose (par exemple la génération de céramide) alors que d'autres ont un effet inverse (par exemple l'activation de NF-KB ou de certaines isoformes de la protéine kinase C).

L'apoptose n'est pas la seule forme de mort cellulaire induite par les agents cytotoxiques dans les cellules leucémiques. Des lignées cellulaires dont la sensibilité à l'apoptose induite par un agent cytotoxique est très différente peuvent avoir une sensibilité identique à cet agent dans un test clonogénique ou un modèle *in vivo*. Néanmoins, la compréhension des mécanismes de mort cellulaire par apoptose devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles pour tenter de sensibiliser les cellules leucémiques aux agents cytotoxiques, voire de provoquer directement, et le plus spécifiquement possible, la mort de ces cellules.

C'est sur la base de cette hypothèse que nous avons entrepris notre travail de thèse. Nous avons choisi de nous intéresser au rôle des caspases dans l'apoptose des cellules leucémiques exposées à un agent cytotoxique. Nous avons d'abord identifié la capacité des agents cytotoxiques à induire la transcription de gènes codant pour les caspases (gènes *CASP*) avant la mise en route du processus de mort cellulaire proprement dit. Ces premiers résultats nous ont conduit à nous focaliser progressivement sur la caspase-2 (encore appelée Ich-1) dont la régulation transcriptionnelle est

particulièrement marquée dans notre modèle d'étude (principalement les cellules leucémiques U937 exposées à l'étoposide). Deux isoformes de cette caspase avait été décrites : une isoforme longue dont la surexpression induit l'apoptose et une isoforme courte dont la surexpression peut avoir un effet protecteur de la mort cellulaire. Nous avons identifié deux autres isoformes synthétisées en faible quantité dans les cellules. Nous nous sommes interessés à la fonction de chacune de ces isoformes.

Ces travaux nous ont conduit aux conclusions suivantes :

- L'isoforme longue de la caspase-2, caspase-2L, participe à l'activation de la procaspase-8 dans les cellules exposées aux agonistes de Fas. Cette observation faite dans la lignée U937 a été confirmée dans les lignées Jurkat et CEM. La caspase-2L accélère ainsi la cinétique de l'apoptose induite par le ligand de Fas sans être indispensable à cette voie d'activation. Cet effet s'exerce sans que la caspase-2L interagisse directement avec les éléments constitutifs du complexe associant Fas, FADD et la procaspase-8 (DISC).

- L'isoforme courte de la caspase-2, caspase-2S, interfère avec la condensation de la chromatine et les modifications membranaires associées à l'apoptose des cellules U937 exposées à l'étoposide. Elle n'a aucun effet sur la cascade d'activation des autres caspases, ni sur la fragmentation internucléosomale de l'ADN.

- L'isoforme de la caspase-2L que nous avons identifiée, caspase-2L-Pro, interagit avec le prodomaine de la procaspase-2L et la molécule adaptatrice RAIDD et protège partiellement les cellules Namalwa de la mort induite par les agents cytotoxiques et les agonistes des récepteurs à domaine de mort. La mutation du site d'interaction de l'isoforme ProL avec la procaspase-2L et avec RAIDD supprime cette activité biologique.

Ces résultats seront présentés en détail dans les pages qui suivent, après une synthèse des connaissances actuelles concernant le rôle des caspases, et singulièrement de la caspase-2, dans la mort cellulaire par apoptose.

Université de Bourgogne

U.F.R. de Médecine

et

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

Identification des caspases impliquées dans l'apoptose des cellules leucémiques humaines: rôle et fonction des isoformes de la caspase-2.

présentée et soutenue à l'Université de Bourgogne par:

Nathalie Droin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président et membre du jury	Jacqueline Marvel, Docteur INSERM Unité 503
Directeur de recherche (Université de Bourgogne)	Eric Solary, Professeur INSERM Unité 517
Directeur de recherche (Université de Montréal)	Richard Bertrand, Docteur C.R. du C.H.U.M.
Membre du jury	Guy Poirier, Docteur C.R. du C.H.U.L.
Membre du jury	Bernard Mignotte, Professeur Université de Versailles/St Quentin
Examinateur externe	Fabien Calvo, Professeur Institut de Génétique Moléculaire
Représentant du doyen de la FES	Richard Bertrand, Docteur C.R. du C.H.U.M.

Thèse acceptée le: 30 octobre 2000

TABLE DES MATIERES

Sommaire i
Table des matières iv
Liste des figures vii
Liste des tableaux xi
Liste des sigles et abréviations xii
Remerciements xiii

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 1

1.1 - Notions générales 1
1.2 - Les différentes phases de l'apoptose 4
1.2.1 - La phase d'induction - l'exemple des agents cytotoxiques 4
1.2.2 - Les récepteurs à domaine de mort cellulaire 7
1.2.3 - Le rôle de la mitochondrie 9
1.2.4 - La phase d'exécution 13
1.3 - Les caspases 15
1.3.1 - Les caspases sont des enzymes très conservées au cours de l'évolution 16
1.3.2 - Les leçons de l'invalidation génique 18
1.3.3 - Classifications des caspases 19
1.3.4 - Mécanismes d'activation des caspases 24
1.3.4.1 - Activation par recrutement 24
1.3.4.2 - Transactivation des caspases 28
1.3.4.3 - Autoactivation des caspases 29
1.3.5 - Régulation de l'activité des caspases 31
1.3.6 - Relations caspases / apoptose 39
1.3.6.1 - L'apoptose dépendant des caspases 39
1.3.6.2 - L'apoptose indépendante des caspases 40
1.3.6.3 - L'activation des caspases sans apoptose 41
1.4 - La caspase-2 42
1.5 - Objectifs du projet 51

CHAPITRE 2 Expression des messagers *CASP* 52

2.1 - Upregulation of CASP genes in human tumor cells undergoing etoposide-induced apoptosis (Oncogene 16, 2885-2894, 1998) 52
2.2 - Effet de la surexpression de Bcl-2 sur l'expression des messagers *CASP* dans d'autres lignées 64
2.3 - La voie apoptotique dépendant de Fas n'induit pas une augmentation des messagers *CASP* 66

CHAPITRE 3 Rôle de la procaspase-2L dans l'apoptose induite par Fas dans les cellules leucémiques humaines 67

3.1 - Choix de l'agent inducteur 67

3.2 - Involvement of caspase-2 long isoform in Fas-mediated cell death of human leukemic cells (Manuscrit en révision - Blood)..... 69

Abstract..... 73
Introduction..... 74
Materials and methods..... 76
Results..... 80
Discussion..... 85
Acknowledgements..... 88
References..... 88
Tables and figures..... 94

CHAPITRE 4 Rôle de la procaspase-2S dans l'apoptose des cellules leucémiques humaines induite par l'étoposide..... 108

4.1 - Modulation of apoptosis by procaspase-2 short isoform: selective inhibition of chromatin condensation, apoptotic body formation and phosphatidylserine externalization (Manuscrit soumis pour publication)..... 108

Abstract..... 111
Introduction..... 112
Materials and methods..... 113
Results..... 117
Discussion..... 120
Acknowledgements..... 125
References..... 126
Tables and figures..... 130

4.2 - Etude des procaspases-2S et -2S mutée dans un système acellulaire..... 142

CHAPITRE 5 Identification et caractérisation d'une nouvelle isoforme de la procaspase-2..... 144

5.1 - Mise en évidence de cette nouvelle isoforme..... 144
5.2 - Identification of a caspase-2 isoform that behaves as an endogenous inhibitor of the caspase cascade (Manuscrit soumis pour publication)..... 146

Abstract..... 149
Introduction..... 150
Materials and methods..... 152
Results..... 158
Discussion..... 161
Acknowledgements..... 166
References..... 166
Tables and figures..... 172

CHAPITRE 6 DISCUSSION; PERSPECTIVES & CONCLUSIONS. 180

6.1 - Rôle des différentes isoformes de la caspase-2 dans l'apoptose.. 180
6.1.1 - L'isoforme longue de la caspase-2 intervient dans l'apoptose induite par l'engagement du récepteur Fas.. 182
6.1.2 - L'isoforme courte de la procaspase-2, procaspase-2S, interfère avec certains aspects phénotypiques de la mort cellulaire par apoptose..... 186
6.1.3 - Une isoforme de la caspase-2 nouvellement identifiée, la caspase-2L-Pro, freine l'apoptose induite par divers stimuli.....189
6.1.4 - Le rôle physiologique des différentes isoformes de la caspase-2 est encore mal défini.....190
6.2 - Régulation transcriptionnelle des messagers CASP.....191

CHAPITRE 7 BIBLIOGRAPHIE..... 196

ANNEXE I Fiches sur les caspases

ANNEXE II Liste des publications et communications

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1: Différentes étapes morphologiques de l'apoptose..... 3

Figure 2: Différentes phases de l'apoptose..... 5

Figure 3: Différents modèles expliquant le relargage des facteurs mitochondriaux..... 12

Figure 4: Modèle de l'apoptosome chez *Caenorhabditis elegans*..... 13

Figure 5: Schéma général d'activation des procaspases..... 15

Figure 6 Analyse phylogénétique de la famille des caspases humaines..... 21

Figure 7: Classification des différentes caspases humaines en fonction de leur spécificité de clivage..... 21

Figure 8: Activation par recrutement de la procaspase-8..... 25

Figure 9: Modèle d'activation de la procaspase-9..... 27

Figure 10: Ordre de trans-activation des procaspases en présence de cytochrome c et de dATP en utilisant des extraits cytosoliques des cellules Jurkat..... 28

Figure 11: Mécanisme hypothétique d'autoactivation de la procaspase-3..29

Figure 12: Séquence en acides aminés des procaspases ayant des motifs RGD et DDX..... 30

Figure 13: Mécanisme d'inhibition de la caspase-9b..... 31

Figure 14: Exemple de régulation par la localisation subcellulaire..... 35

Figure 15: Maturation de la pro-interleukine-1β..... 42

Figure 16: Structure du gène *CASP-2* humain..... 44

Figure 17: Activation par recrutement de la procaspase-2L..... 46

Figure 18: Schéma des surfaces supposées d'intéraction entre les domaines CARD de RAIDD et de la procaspase-2L..... 46

Figure 19: Différents fragments de clivage observés conduisant à l'activation de la procaspase-2L..... 49

Upregulation of CASP genes in human tumor cells undergoing etoposide-induced apoptosis

Figure 1: Expression of *CASP* genes in five human leukemic cell lines

Figure 2: Expression of *CASP* genes in clinical bone marrow samples from *de novo* acute myelogenous leukemias..... O2886

Figure 3: Expression of *CASP* genes, activation of procaspases, PARP cleavage and apoptotic DNA fragmentation in etoposide-treated U937 cells..... O2887

Figure 4: Expression of *CASP* genes in HL60 and K562 cell lines treated with etoposide..... O2888

Figure 5: Expression of *CASP* genes and procaspases in etoposide-treated HT29 cells..... O2889

Figure 6: Expression of *CASP* genes, activation of procaspases, PARP cleavage and apoptotic DNA fragmentation in etoposide-treated U4 cells..... O2890

Figure 7: Transcription of *CASP* genes in etoposide-treated U937 and U4 cells..... O2890

Figure 8: Influence of tetrapeptide inhibitors Z-VAD and Z-DEVD upon etoposide-induced *CASP* genes modulation in U937 cells..... O2890

Effet de la surexpression de Bcl-2 sur l'expression des messagers *CASP* dans d'autres lignées

Figure 20: Etude de la surexpression de Bcl-2 sur l'expression des messagers *CASP* au cours d'un traitement par l'étoposide.... 65

La voie apoptotique dépendant de Fas n'induit pas une augmentation des messagers *CASP*

Figure 21: Etude de l'expression des messagers *CASP* au cours d'un traitement par un anticorps agoniste de Fas..... 66

Involvement of caspase-2 long isoform in Fas-mediated cell death of human leukemic cells

Figure 22: Caractérisation du clone U937/AS1 sous-exprimant la procaspase-2L..... 68
Figure 1: Characterization of U937 cells stably transfected with *CASP2L/AS*..... 94
Figure 2: Down regulation of procaspase-2L expression delays anti-Fas Ab-induced apoptosis in U937/AS3 cells..... 96
Figure 3: Decreased expression of procaspase-2L prevents activation of the mitochondrial pathway to cell death..... 98
Figure 4: Decreased expression of procaspase-2L prevents anti-Fas Ab-mediated procaspase-8 activation..... 100
Figure 5: *CASP2L/AS* transfection delays anti-Fas Ab-mediated apoptosis in Jurkat and CEM cell lines..... 101
Figure 6: Western blot analyses in Jurkat cells exposed to anti-Fas Abs.102
Figure 7: The caspase-2 permeant inhibitor Z-VDVAD-fmk prevents Fas-induced apoptosis of parental U937 and Jurkat cells..... 103
Figure 8: Lack of interaction of procaspase-2L with components of the DISC in anti-Fas Ab-treated U937 cells..... 104
Figure 9: Decreased expression of procaspase-2L does not inhibit the formation of the DISC..... 105
Figure 10: Decreased expression of procaspase-2L prevents anti-Fas Ab-induced c-FLIP cleavage..... 106
Figure 11: TRAIL-induced apoptosis is delayed in *CASP2L/AS* -transfected cells..... 107

Modulation of apoptosis by procaspase-2 short isoform: selective inhibition of chromatin condensation, apoptotic body formation and phosphatidylserine externalization

Figure 1: Role of procaspase-2S in etoposide-induced apoptosis..... 130
Figure 2: Characterization of U937 cells stably transfected with wild type- and mutated-*CASP-2S* expressing vector..... 131
Figure 3: Influence of procaspase-2S overexpression on the ultrastuctural morphology of U937 cells exposed to etoposide..... 132
Figure 4: Procaspase-2S overexpression modulates apoptosis related-morphological changes..... 135

Figure 5: Procaspase-2S overexpression prevents cell shrinkage induced by etoposide exposure..... 136
Figure 6: Procaspase-2S overexpression delays phosphatidylserine externalization on the membrane of etoposide-treated cells.. 137
Figure 7: Procaspase-2S overexpression does not affect DNA fragmentation in etoposide-treated cells..... 138
Figure 8: Etoposide-induced changes in the expression of various cellular proteins..... 139
Figure 9: Kinetics of caspase-2L activity after etoposide treatment..... 140
Figure 23: Etude de la surexpression des procaspase-2S et -2S mutée dans un système acellulaire..... 143

Identification of a caspase-2 isoform that behaves as an endogenous inhibitor of the caspase cascade

Figure 24: Identification d'une nouvelle isoforme de la procaspase-2... 145
Figure 1: Nucleotide and deduced amino acid sequences of caspase-2L-Pro..... 172
Figure 2: Expression of caspase-2L-Pro in human tissues and cancer cell line..... 174
Figure 3: Caspase-2L-Pro interacts with procaspase-2L and RAIDD..... 175
Figure 4: Caspase-2L-Pro interferes with caspase activities in a cell-free system assay..... 176
Figure 5: Transient expression of caspase-2L-Pro induces apoptosis..... 177
Figure 6: Caspase-2L-Pro overexpression inhibits apoptosis induced by different stimuli..... 178
Figure 7: Kinetics of caspase activities after VP16 treatment..... 179

DISCUSSION, PERSPECTIVES & CONCLUSIONS

Figure 25: Mécanisme de régulation hypothétique de STAT-1 par les caspases..... 194

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau I: Apoptose/Nécrose: deux morts cellulaires aux caractéristiques morphologiques très différentes..... 1

Tableau II: Liste incomplète des substrats clivés par les caspases pendant l'apoptose..... 23

Tableau III: Prodomaines et adaptateurs connus des différentes procaspases..... 24

Tableau IV: Les protéines de la famille Bcl-2..... 38

Upregulation of CASP genes in human tumor cells undergoing etoposide-induced apoptosis

Table 1: Primers used for RT-PCR analysis of CASP genes in leukemic cells..... O2886

Modulation of apoptosis by procaspase-2 short isoform: selective inhibition of chromatin condensation, apoptotic body formation and phosphatidylserine externalization

Table 1: Percentage of apoptotic cell after etoposide-treatment..... 141

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

Ac-DEVD-AMC : acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methyl-coumarin
Ac-LEHD-AFC : acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin
Ac-VEID-AFC : acetyl-Val-Glu-Ile- Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AIF : apoptosis inducing factor
ANT : adenine nucleotide translocator
Apaf : apoptosis protease activating factor
ARN : acide ribonucléique
ATP : adenosine tri-phosphate
BH : Bcl-2 homology domain
BIR : baculovirus IAP repeats
CAD : caspase-activated Dnase
CARD : caspase recruitment domain
Ced : cell death abnormal
Ci : curies
CPT : 20-S-camptothecin lactone
CrmA : cytokine response modifier A
Csp : caspase related gene
dATP : deoxy adenosine-tri-phosphate
DD : death domain
DED : death effector domain
DFF : DNA fragmentation factor
DISC : death inducing signaling complex
$\Delta\Psi m$: mitochondrial inner transmembrane potential
DNA : deoxyribonucleic acid
DRD : death effector recruting domain
Egl : egg laying defective
FADD : Fas-associated death domain
FasL : Fas ligand
GFP : green fluorescent protein
HA-tag : hemagglutinin epitope tag sequences
HIS-tag : histidine tag sequences
IAP : inhibitor of apoptosis proteins
ICAD : inhibitor of caspase-activated Dnase
ICE : interleukin-1β-converting enzyme
ICH : Ice and Ced-3 homolog
kDa : kilodalton
kbp : kilo base pair
kpb : kilo paire de bases
MCA-VDVADGWK (DNP)-NH2 : 7-methoxycoumarin-4yl-acetyl-Val-Asp-Val-Ala-Asp-Gly-Trp-Lys-dinitrophenol-NH2
MORT-1 : mediator of receptor-induced toxicity 1
Nedd2 : neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated
PARP : poly(ADP-ribose)polymérase
pb : paire de bases
PHA : phytohémaglutinine
RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
TM : transmembranaire
TNF : tumor necrosis factor
TNFR : tumor necrosis factor receptor
TRADD : TNFR-associated death domain
TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand
VDAC : voltage dependent anion channel
VP-16 : etoposide
z-VDVAD-AFC : benzyloxycarbonyl-Val-Asp-Val-Ala-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin

REMERCIEMENTS:

Je remercie Monsieur le Professeur Eric SOLARY de m'avoir accueillie dans son laboratoire et permis de découvrir le monde fascinant de la Recherche Fondamentale. Eric, je te remercie pour ton soutien, ton dynamisme, ta disponibilité (quoique..... un peu « overbooké » ces dernières années) et ton humour. Je te remercie aussi pour m'avoir laissée la liberté de travailler sur la caspase-2 (Finalement pas totalement inintéressante !!!!). Je te remercie surtout de m'avoir permis de réaliser cette thèse en cotutelle avec le Québec, d'avoir donné une nouvelle dimension à mes connaissances et de t'être déplacé jusqu'à Montréal pour encadrer mon travail. Enfin, je te félicite de m'avoir supportée pendant toutes ces années (peut-être que ces félicitations devraient me revenir !!!!). Heureusement, tu as eu une coupure d'un an et demi !!!!

Je remercie Monsieur le Docteur Richard BERTRAND de m'avoir accueillie dans son laboratoire à Montréal avec vue sur le centre ville (longues heures de contemplation, n'est-ce pas !!!) et de m'avoir permis de réaliser cette thèse en cotutelle en prenant le relais. Richard, je te remercie pour ton soutien, ton humour, ta disponibilité et tes compétences en biologie moléculaire. Je te remercie aussi de m'avoir aidée à poursuivre mes travaux sur les différentes isoformes de la caspase-2 (CASP-2L, CASP-2S, CASP-2LPro, CASP-2ProL, CASP-Pro2L, CASP-2#!!# ..... tout de même un peu mélangeant !!!!). Enfin, je te remercie de t'être déplacé jusqu'à Dijon pour assister à ma soutenance de thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Bernard MIGNOTTE et Monsieur le Docteur Guy POIRIER pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger mon travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Fabien CALVO et Madame le Docteur Jacqueline MARVEL d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également le Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie, le Ministère des Affaires Etrangères, le Consulat Général de France à Québec, le Ministère des Relations Internationales du Québec et la Société Française d'Hématologie de leur soutien financier.

Merci à tous mes ami(e)s dijonnais(es) .....
Tout d'abord, à Laurence qui m'a montré les « B.A.BA » de la culture cellulaire et avec qui j'ai partagé déceptions mais surtout joies pendant ces premières années. A Béa, pour son humour et son petit côté « grognon » fort attachant ma foi !!!! Et oui, aujourd'hui c'est déjà mon tour. Je vous souhaite à toutes les deux plein de bonheurs et de réussites dans vos vies respectives (cela me semble bien parti .....). A Philippe et Olivier D qui ont su me mettre à l'aise lors de notre première rencontre (en réalité, le jour où j'ai compris qu'ils blaguaient ... c'était hier, non !!!). Aux Oliviers, à Olivier M pour son énergie (toujours à 100 à l'heure) et à Olivier S pour son calme (environ, deux de tension), entre vous deux j'ai su trouver un équilibre. A Monika, à sa gentillesse et à nos manips de clonage, et oui, on a tout de même réussi à les cloner tous ces ADNc. A mes deux élèves très disciplinées, Juliette et Anne (fallait pas croire tout ce que je vous ai dit !!!! non, c'est une joke.). A mon stagiaire surprise, Cédric, qui a décidé de rester pour faire une thèse (stage plus long que prévu, non !!!) et dont l'humour anime les corridors du laboratoire. A Sophie et ses bons conseils pour le tricot. A Sissi et ses petits biscuits. A Rodolphe quoique !!!! mais bon c'est bien parce que c'est toi ... (Et oui, je t'embêterai jusqu'à la fin !!!). A Madame Arlette et ses bons petits plats. A Florence, à Ali, à Carmen (et sa joie de vivre...), à Marie-Thérèse, à Laurent, à Sandrine, à Jean-Marie, à Bernard, à Nathalie (qui m'as doublée....), aux Patrick (O. et D.), à Stéphane, à..... En résumé, à toute l'unité INSERM 517 (comme ça, je suis sure de n'oublier personne). Ah si !!! A Stéphanie qui cache bien son accent mais non je ne t'ai pas oubliée.... tu vas me permettre de faire la transition avec un pays cher à ton coeur, le Québec.....

Enfin, merci à tous mes ami(e)s québécois(es) qui m'ont fait connaître et aimer leur immense pays .....
A Estelle et nos concours de pas (tu as gagné haut la main !!!!). A Claudie, à l'agrément (en tout cas, on en a eu !!!!). A Stef et nos échanges de vocabulaires très enrichissants mais certains mots ne sont pas de moi, définitivement, ça s'peut-tu ???? A Myriam et sa bonne humeur .... A Alain-Théophile et ses proverbes. A Michela, Zoulfia, Abbes, à toute la gang de salsa et à toute la gang de l'Institut du Cancer de Montréal: on a ben eu du fun !!!!

Merci à vous tous, pour toutes ces années inoubliables. Vous m'avez supportée (il parait que j'ai un sale caractère, dixit Eric ...), vous m'avez fait rire, vous m'avez remonté le moral quand il était au plus bas, mais ce n'est pas un adieu juste un au revoir .....

A mes Parents, A Christophe,

pour votre soutien et vos encouragements
pendant ces longues années d'étude

A toute ma Famille,

votre intérêt me touche

A mon Parrain, A ma Marraine,
A mon Grand-Père, A ma Grand-Mère,

vous serez toujours avec Moi

« Felix qui potuit rerum cognoscere causas. »

Virgile, Georgiques, II, 489

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 - Notions générales :

Définition : Le terme *Apoptose* , apparu dans le vocabulaire biologique et médical en 1972 (Kerr *et coll.*, 1972), a pour origine "αποπτω–σιεz ", mot grec signifiant "chute" utilisé par Hippocrate en 460-370 avant Jésus-Christ pour décrire la chute des feuilles ou des pétales de fleur (Eposti, 1998). Il est utilisé pour décrire une forme de mort cellulaire observée pour la première fois par Flemming en 1885. Il s'agit d'une mort cellulaire ordonnée, génétiquement déterminée, qui se distingue morphologiquement et biochimiquement d'une autre forme de mort cellulaire, la nécrose (Tableau I).

Caractéristiques	Nécrose	Apoptose
Condition de la mort	"catastrophique "	programmée
Mode	passif	actif (ATP dépendant)
Volume cellulaire	augmenté	diminué
Densité cellulaire	diminuée	augmentée
Concentration en Ca^{2+}	diminuée	augmentée
Lyse membrane plasmique	première étape	dernière étape
Hydrolyse de l'ADN	étape tardive	étape précoce
Vitesse d'accomplissement	rapide	lente
Organites cellulaires	lysés	compacts
Cicatrisation	cicatrice fibreuse	pas de cicatrice

Tableau I: Nécrose/Apoptose: deux morts cellulaires aux caractéristiques morphologiques très différentes.

Les diverses formes de la mort cellulaire : A côté de la nécrose (mort passive, explosive) et de l'apoptose (mort active, implosive), une mort autophagique caractérisée par l'apparition de nombreuses vacuoles dans le cytoplasme et une fragmentation tardive de l'ADN nucléaire a aussi été décrite (Schweichel & Merker, 1973). Ces cellules peuvent être occasionnellement phagocytées par les cellules voisines (Kitanaka & Kuchino, 1999, pour revue). Il s'agirait d'une mort cellulaire programmée distincte de l'apoptose.

Elle a été observée, par exemple, dans des cellules dans lesquelles la mort a été induite *in vitro* par activation de la voie de signalisation passant par Ras et dans le cerveau de patients décédés de maladies de Parkinson ou d'Alzheimer (Cataldo *et coll.*, 1995; Anglade *et coll.*, 1997).

Aspects morphologiques de l'apoptose : L'apoptose se caractérise par une condensation et une fragmentation du noyau et du cytoplasme. La première étape est une augmentation de la densité cellulaire par perte d'eau sans perte de macromolécules (Figure 1). Dans le cytoplasme condensé, la morphologie des organites intracellulaires est globalement préservée. La chromatine se condense aussi et s'étire le long de la membrane nucléaire tandis que les pores nucléaires s'agrandissent (Carson & Ribeiro, 1993, pour revue). Les structures spécialisées de la surface cellulaire et les contacts avec les cellules voisines disparaissent. Le réticulum endoplasmique forme des bulles sous la membrane plasmique qui fusionnent avec elle pour former de petites vésicules (*"blebs"* ou bourgeonnement cellulaire). Puis, le noyau et le cytoplasme se fragmentent pour constituer des corps apoptotiques formés de fragments nucléaires et / ou cytoplasmiques entourés par une membrane excluant le bleu trypan (Sgonc & Wick, 1994, pour revue).

Modifications de la membrane plasmique : Contrairement à ce qui est observé dans la nécrose, la membrane plasmique conserve une certaine intégrité : elle ne se rompt pas et ne présente aucune altération majeure de sa perméabilité. Elle subit néanmoins des modifications qui permettront aux corps apoptotiques d'être reconnus par les cellules phagocytaires. Cette reconnaissance implique le récepteur de la vitronectine à la surface du macrophage, ainsi que CD36 et la thrombospondine. Elle est favorisée par les modifications des glucides de la membrane plasmique, notamment la perte des molécules d'acide N-acétylneuraminique, et par la translocation des molécules de phosphatidylsérine du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique. Le récepteur de la phosphatidylsérine, récemment isolé, est exprimé à la surface des macrophages, des fibroblastes et des cellules épithéliales (Fadok *et coll.*, 2000).

Fragmentation de l'ADN nucléaire : Elle se fait en plusieurs étapes avec la formation de grands fragments de 50 à 300 kpb, visualisée par électrophorèse de l'ADN en champ pulsé, précédant la formation de fragments de 180 à 200 pb (fragmentation internucléosomale) qui donnent un aspect en "échelle" lorsque l'on fait migrer l'ADN dans un gel d'agarose (Wyllie, 1980). Cette fragmentation organisée s'oppose à la fragmentation aléatoire de l'ADN au cours de la nécrose.

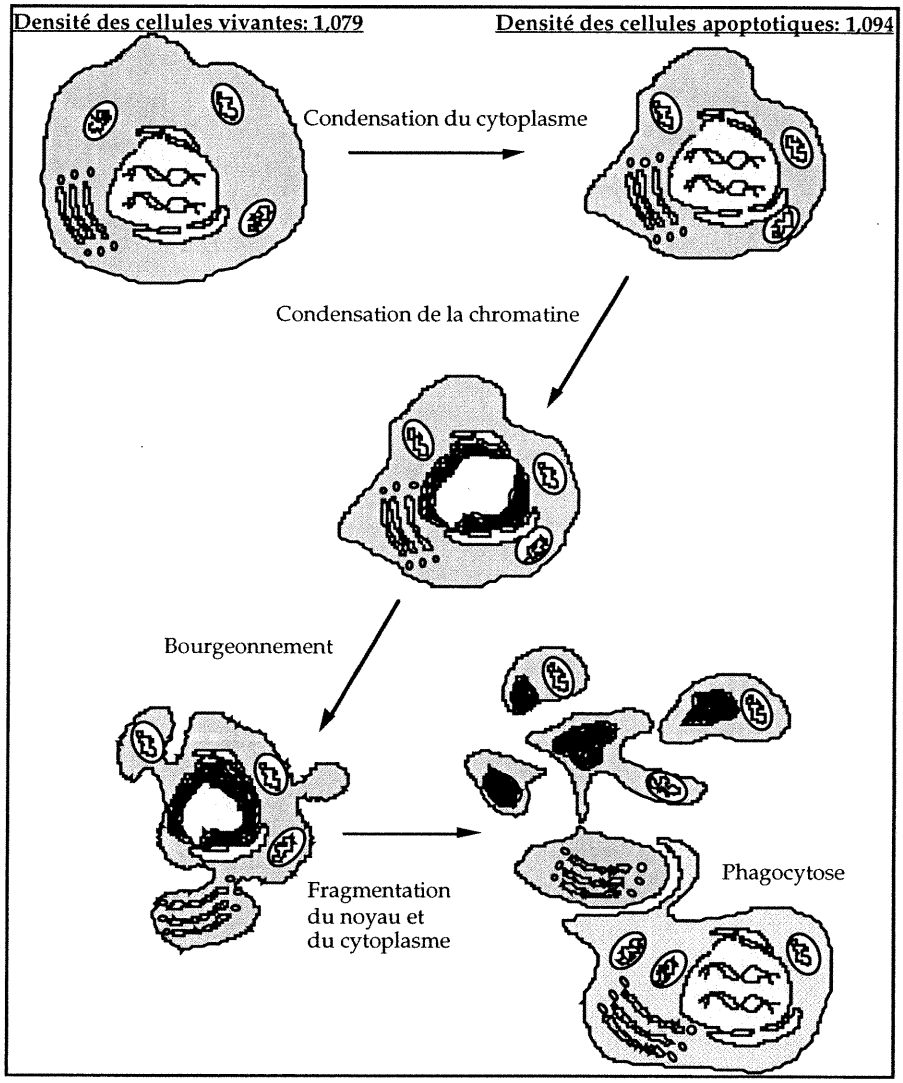


Figure 1: Différentes étapes morphologiques de l'apoptose

Rôles physiologiques : L'apoptose est nécessaire à la formation des organes et des tissus au cours du développement puis au maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte (Cecconi *et coll.*, 1998; Golstein, 1998). Au cours du développement embryonnaire, elle est impliquée dans la disparition de

certains tissus dont l'exemple le plus souvent cité est la membrane interdigitale. Dans un organisme adulte, elle a un rôle physiologique essentiel, par exemple pour éliminer les lymphocytes T activés lors d'une réponse immunitaire (Surh *et coll.*, 1994). Elle permet aussi l'élimination de cellules devenues anormales du fait de leur déplacement dans l'organisme, par exemple à la suite d'une effraction tissulaire accidentelle, ou de l'apparition d'anomalies génomiques. Enfin, elle doit maintenir un équilibre permanent avec la prolifération cellulaire.

Rôles physiopathologiques : Compte-tenu de l'importance de l'apoptose en physiologie, tout dérèglement de ce mécanisme biologique fondamental peut avoir des conséquences pathologiques. Un défaut de mort cellulaire peut contribuer à l'apparition d'un clone de cellules tumorales ou de lymphocytes auto-immuns tandis qu'un excès de mort cellulaire est impliqué dans certaines maladies neuro-dégénératives, certaines infections virales ou les conséquences d'une ischémie tissulaire.

1.2 - Les différentes phases de l'apoptose (Figure 2)

On peut distinguer schématiquement 3 phases dans l'apoptose : une phase d'induction au cours de laquelle la cellule reçoit et intègre un signal de mort, une phase de régulation qui s'organise le plus souvent autour de la mitochondrie et fait intervenir les protéines de la famille Bcl-2, les protéases de la famille des caspases et des molécules adaptatrices comme Apaf-1, et une phase d'exécution au cours de laquelle les effecteurs de l'apoptose, principalement les caspases, assurent la dégradation des principaux constituants protéiques de la cellule.

1.2.1 - La phase d'induction - l'exemple des agents cytotoxiques :

Tous les agents cytotoxiques utilisés en chimiothérapie peuvent induire l'apoptose dans des lignées de cellules tumorales. Par contre, toutes les cellules tumorales ne sont pas sensibles à l'apoptose induite par un agent cytotoxique donné. Chaque agent cytotoxique pénètre dans la cellule cible, est

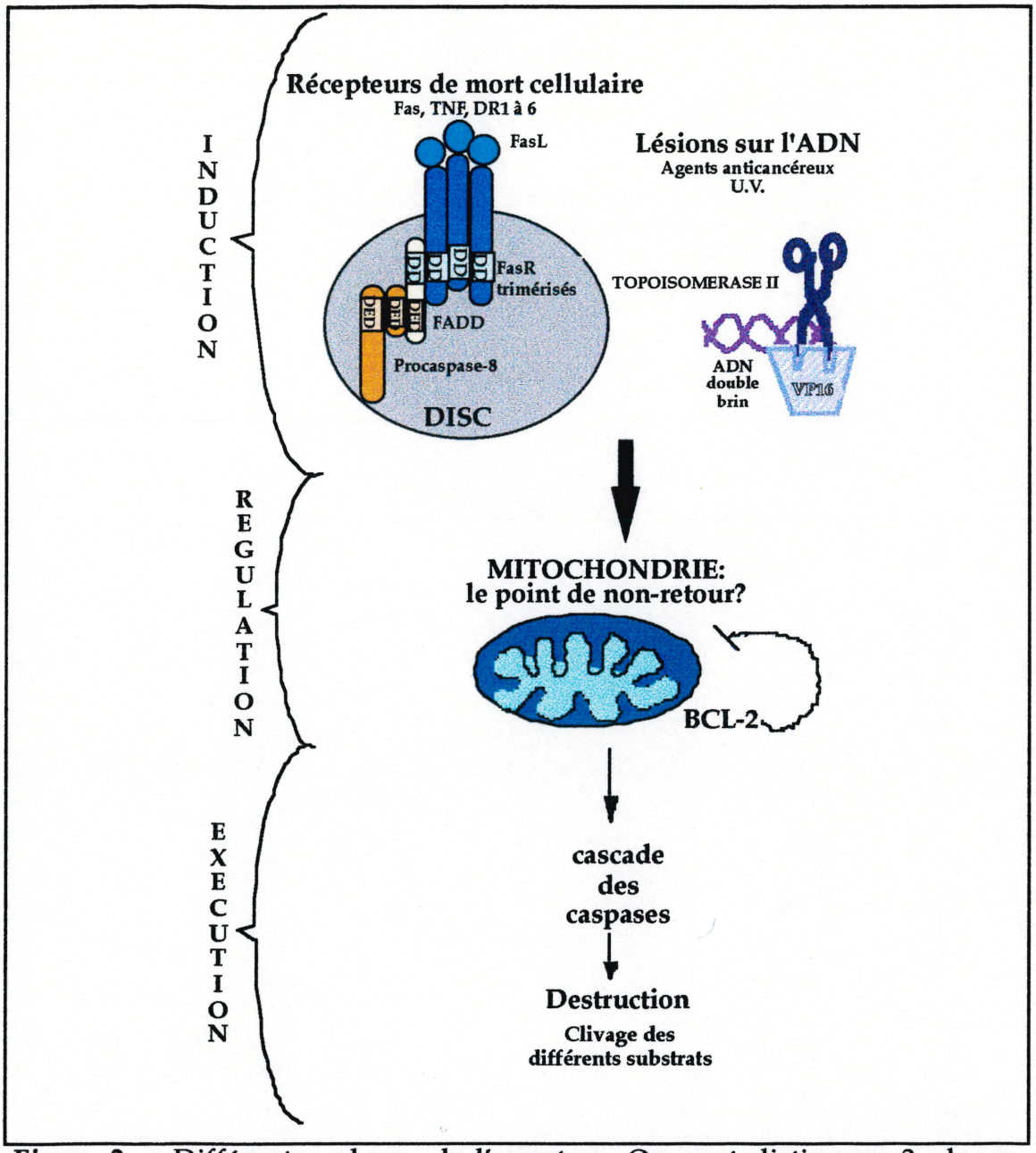


Figure 2: : Différentes phases de l'apoptose. On peut distinguer 3 phases. Une phase d'**induction** déclenchée par les récepteurs de mort cellulaire dont FasR induisant la formation du DISC ou par les agents anticancéreux comme l'étoposide (VP16) ou les U.V.. Une phase de **régulation** faisant intervenir la mitochondrie. Une phase d'**exécution** faisant intervenir une cascade protéolytique provoquant la destruction de la cellule à cause du clivage d'un grand nombre de protéines cibles.

éventuellement métabolisé, interagit avec une ou plusieurs cibles, et provoque des lésions qui activent le programme de mort cellulaire.

L'exemple des inhibiteurs de topoisomérase : L'étoposide ou VP16 est une épipodophyllotoxine qui stabilise les complexes de clivage formés par la liaison covalente mais habituellement très transitoire de la topoisomérase II et de l'ADN. La camptothécine agit par un mécanisme analogue, empêchant la religation de l'ADN en formant un complexe ternaire avec la topoisomérase I et l'ADN. Lorsqu'elles sont importantes et dans des cellules sensibles, ces lésions double-brin ou simple-brin de l'ADN activent le programme de mort cellulaire par apoptose.

Des lésions spécifiques à l'apoptose : Les mécanismes conduisant des lésions de l'ADN (ou d'autres lésions spécifiques induites par un agent cytotoxique) à l'activation du programme de mort cellulaire sont encore très peu connus. Ils semblent faire intervenir des kinases comme la DNA-PK (*"DNA-dependent Protein Kinase"*) et la protéine ATM (*"Ataxia-Telangiectasia Mutated"*) dont l'une des principales cibles est le facteur de transcription p53 (Woo *et coll.*, 1998; Waterman *et coll.*, 1998). La phosphorylation de p53 permet à la protéine d'induire un arrêt de la progression des cellules dans le cycle cellulaire, de réparer les lésions induites par l'agent cytotoxique, ou d'induire la mort cellulaire par apoptose. Les mécanismes par lesquels p53 déclenche l'apoptose sont encore très controversés. De plus, les cellules p53 négatives, comme la lignée U937 sur laquelle nous travaillons, meurent par apoptose sous l'effet de l'étoposide ou de la camptothécine, indiquant que p53 n'est pas indispensable au déclenchement de la mort cellulaire.

Les voies parallèles : Parallèlement aux lésions intracellulaires spécifiques, les agents cytotoxiques activent un certain nombre de voies de signalisation intracellulaires qui modulent sa capacité à mourir par apoptose. Ces voies de signalisation impliquent, par exemple, la génération de seconds messagers lipidiques (céramide ou diacylglycérol) ou le facteur de transcription NF-κB. Nous avons envisagé leur rôle dans la modulation de l'apoptose dans une revue actuellement sous presse (Solary *et coll.*, 2000).

Les 2 voies de l'apoptose : De nombreux arguments suggèrent que l'apoptose

provoquée dans les cellules leucémiques par les agents cytotoxiques met en jeu une voie principale passant par la mitochondrie. Cependant, dans certaines cellules, une voie d'amplification passant par le récepteur Fas (CD95/APO-1) pourrait jouer un rôle. Nous envisagerons d'abord cette voie annexe avant de décrire la voie mitochondriale.

1.2.2 - Les récepteurs à domaine de mort cellulaire :

La famille du Facteur Nécrosant des Tumeurs (TNF) : Il s'agit d'une famille de récepteurs transmembranaires ayant en commun, au niveau de leur partie extracellulaire, des motifs riches en cystéines (CRDs ou *"Cysteine-Rich Domains"*) qui participent à leur interaction avec leur ligand respectif. Leur domaine intracellulaire est dépourvu de toute activité enzymatique mais l'interaction du récepteur avec son ligand spécifique provoque le recrutement de protéines cytosoliques par l'intermédiaire de domaines d'interaction protéine-protéine. La nature de la protéine recrutée, qualifiée de protéine adaptatrice, détermine la réponse cellulaire à l'interaction ligand / récepteur. La famille du TNF comporte actuellement plus de 24 membres (Golstein, 1997, pour revue). Ces récepteurs sont impliqués notamment dans la réaction inflammatoire et la réponse immunitaire.

Les récepteurs à domaine de mort : Au sein de la famille du TNF, on distingue un sous-groupe de récepteurs caractérisés par la présence, au niveau de leur partie carboxy-terminale intracytoplasmique, d'un domaine d'environ 80 acides aminés, le domaine de mort (DD ou *"Death Domain"*). Il s'agit de

	DR1	(TNFR1/p55/CD120a),
	DR2	(Fas/Apo1/CD95),
	DR3	(Apo3/WSL-1/TRAMP/LARD),
	DR4	(TRAIL-R1)
	DR5	(TRAIL-R2/TRICK2/KILLER)
	DR6.	

Le domaine de mort peut interagir avec un motif homologue des protéines adaptatrices appelées TRADD (*"TNF Receptor-Associated Death Domain*

protein") ou FADD ("*Fas-Associated Death Domain protein*") capables de recruter et d'activer des caspases, conduisant ainsi à la mort par apoptose.

Les ligands des récepteurs à domaine de mort : Il s'agit de protéines membranaires à domaine carboxy-terminal extracellulaire appartenant à la famille du TNF (Ashkenazi & Dixit, 1998, pour revue). Ces ligands (TNF-alpha, CD95-ligand/FasL, Apo3-L/TWEAK et Apo2-L/TRAIL) existent aussi sous forme soluble. Leur forme active est constituée de l'association de trois molécules identiques et doit interagir avec un récepteur homotrimérique pour déclencher une cascade de signalisation dans la cellule. On a longtemps pensé que le ligand homotrimérique provoquait l'agrégation des monomères de récepteur. Par exemple, on considérait que le ligand de Fas (Fas-L) sous forme homotrimérique déclenchait l'homotrimérisation du récepteur Fas. Cette oligomérisation, en rapprochant trois domaines de mort dans le cytosol, était supposée permettre le recrutement de la molécule adaptatrice FADD qui, elle-même, recrutait la procaspase-8 dont l'activation déclenche la cascade d'évènements conduisant à l'apoptose. Deux publications récentes suggèrent que la trimérisation de Fas et des autres récepteurs de la famille TNFR existe avant toute interaction avec leur ligand (Siegel *et coll.*, 2000; Chan *et coll.*, 2000). Cette trimérisation serait même un prérequis à l'interaction ligand / récepteur.

Les PLADs : L'oligomérisation des récepteurs de la famille TNFR fait intervenir un domaine amino-terminal extracellulaire appelé PLAD ("*Pre-Ligand-binding Assembly Domain*"). Ce domaine est bien entendu distinct du domaine de mort ou du domaine d'association aux TRAFs (qui sont intracytoplasmiques) mais est aussi distinct du domaine d'interaction des récepteurs de la famille TNFR avec leur ligand spécifique. Un PLAD a été identifié au niveau de la partie extracytoplasmique de TNFR1, TNFR2, CD40, Fas et DR4 (Chan *et coll.*, 2000). Le PLAD est donc probablement une caractéristique commune à l'ensemble des récepteurs de la famille TNFR. Chaque PLAD est spécifique de son récepteur pour éviter toute oligomérisation entre des récepteurs non homologues (Chan *et coll.*, 2000).

Le DISC : Les protéines adaptatrices FADD et TRADD permettent de recruter et d'activer la caspase-8 ou la caspase-10 (Ashkenazi & Dixit, 1998, pour revue). La formation du complexe récepteur / molécule adaptatrice / procaspase (DISC ou *"Death inducing signaling complex"*) peut être induite par le ligand naturel ou par un anticorps agoniste (Yonehara *et coll.*, 1989; Trauth *et coll.*, 1989; Medema *et coll.*, 1997; Schneider *et coll.*, 1997; Bodmer *et coll.*, 2000) (Figure 2). Fas, DR4 et DR5 semblent interagir directement avec FADD tandis que TNF-R1 interagit avec TRADD qui, à son tour, interagit avec FADD. L'adaptateur et les caspases impliquées dans les voies de signalisation du récepteur DR6 sont encore méconnus. En aval de la caspase-8, deux voies d'activation de la mort cellulaire sont possibles : l'une est une activation directe de la cascade des caspases tandis que l'autre passe par la mitochondrie (Scaffidi *et coll.*, 1998).

Récepteurs à domaine de mort et chimiothérapie : Dans certaines cellules tumorales, les médicaments anticancéreux augmentent l'expression de Fas, provoquent le recrutement de FADD et de la procaspase-8 au niveau de Fas et activent la cascade des caspases. Des travaux réalisés dans notre laboratoire suggèrent que cet effet ne nécessite pas l'intervention de Fas-L (Micheau *et coll*, 1997; Micheau *et coll*, 1999a). L'augmentation de la densité de Fas à la surface des cellules pourrait favoriser l'assemblage de multiples trimères de Fas, comme le font les ultraviolets (Aragane *et coll.*, 1998), déclenchant le recrutement de FADD et de la procaspase-8. Cependant, d'autres auteurs suggèrent que les agents cytotoxiques provoquent la synthèse du ligand de Fas qui, en interagissant avec son récepteur à la surface des cellules tumorales, provoque la formation du DISC aboutissant à l'activation de la caspase-8 (Muller *et coll.*, 1998; Fulda *et coll.*, 2000).

1.2.3 - La voie mitochondriale :

La mitochondrie joue un rôle central dans la plupart des voies de signalisation conduisant à l'apoptose, en particulier celles mises en jeu par les agents cytotoxiques (Kroemer *et coll.*, 1998; Green & Reed, 1998; pour

revue). De nombreux stimuli pro-apoptotiques provoquent une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial (Vayssière *et coll.*, 1994), altèrent la perméabilité de la membrane externe (Van der Heiden *et coll.*, 1997) et induisent le relargage de protéines mitochondriales telles que le cytochrome c, les caspases-2, -3 et -9, certaines protéines de choc thermique comme HSP60 et la flavoprotéine AIF (*"Apoptosis Inducing Factor"*) normalement localisées dans l'espace intermembranaire (Susin *et coll.*, 1996).

Ces molécules pro-apoptotiques d'origine mitochondriale peuvent déclencher l'apoptose en activant les caspases, provoquer une mort cellulaire atypique indépendante des caspases ou une combinaison des deux. Libéré par la mitochondrie, AIF est transloqué directement dans le noyau où il est impliqué dans la digestion de l'ADN en grands fragments (Susin *et coll.*, 1999a). Le relargage du cytochrome c ne semble pas impliquer de transport enzymatique (Goldstein *et coll.*, 2000). Dans le cytosol, le cytochrome c active la cascade des caspases. L'invalidation du gène codant pour le cytochrome c a montré l'importance de cette molécule dans le déclenchement de l'apoptose induite par les agents cytotoxiques et d'autres inducteurs à l'exception notable de TNF (Li *et coll*, 2000).

Bid, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2, semble être le lien entre les récepteurs à domaine de mort comme Fas et le relargage des protéines pro-apoptotiques de la mitochondrie, en particulier le cytochrome c. Bid est clivé par la caspase-8 et son fragment carboxy-terminal, probablement en association avec Bax, provoque la libération de cytochrome c (Luo *et coll.*, 1998; Li *et coll.*, 1998). Plus généralement, en réponse à un stimulus apoptotique, une des molécules à domaine BH3 de la famille Bcl-2 (Bim, Bad, Harakiri etc...) interagit avec une des molécules de type Bax (Bax, Bak, Bok) pour induire les évènements mitochondriaux.

Le mécanisme de libération des molécules pro-apoptotiques mitochondriales reste très controversé. Les modèles proposés sont au

nombre de cinq : les deux premiers impliquent la rupture de la membrane externe de la mitochondrie alors que les trois derniers font intervenir la formation d'un pore dans cette membrane (Figure 3).

Modèle 1 : Il implique l'ouverture d'un mégacanal dénommé PTP (« *Permeability-Transition Pore* »), constitué notamment de la porine (VDAC = Voltage Dependent Anion Channel) sur la membrane externe et de l'Adénine Nucléotide Transporter ANT sur la membrane interne. Bax peut interagir avec VDAC et ANT, provoquant la dépolarisation de la mitochondrie, la pénétration d'eau et de solutés dans la matrice, le gonflement de la mitochondrie et la rupture de sa membrane externe (Marzo*et coll.*, 1998).

Modèle 2 : Il implique une altération des échanges ATP/ADP à cause de la fermeture de VDAC, provoquant l'hyperpolarisation de la membrane interne, le gonflement de la mitochondrie et la rupture de sa membrane externe (van der Heiden & Thompson, 1999).

Modèle 3 : Bax et/ou ses homologues forment un pore suffisamment large pour permettre le passage du cytochrome c et des autres facteurs libérés sans endommagement de la mitochondrie (Schlesinger *et coll.*, 1997; Antonsson *et coll.*, 1997; Jürgensmeier *et coll.*, 1998).

Modèle 4 : Bax et/ou ses homologues provoquent une instabilité membranaire en diminuant la tension de la bicouche lipidique, permettant la formation d'un pore lipidique ou lipido-protéique (Basanez *et coll.*, 1999).

Modèle 5 : Bax s'associe à VDAC pour former un canal perméable au cytochrome c (Shimizu S. *et coll.*, 1999). Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L auraient un effet contraire (Shimizu *et coll.*, 2000).

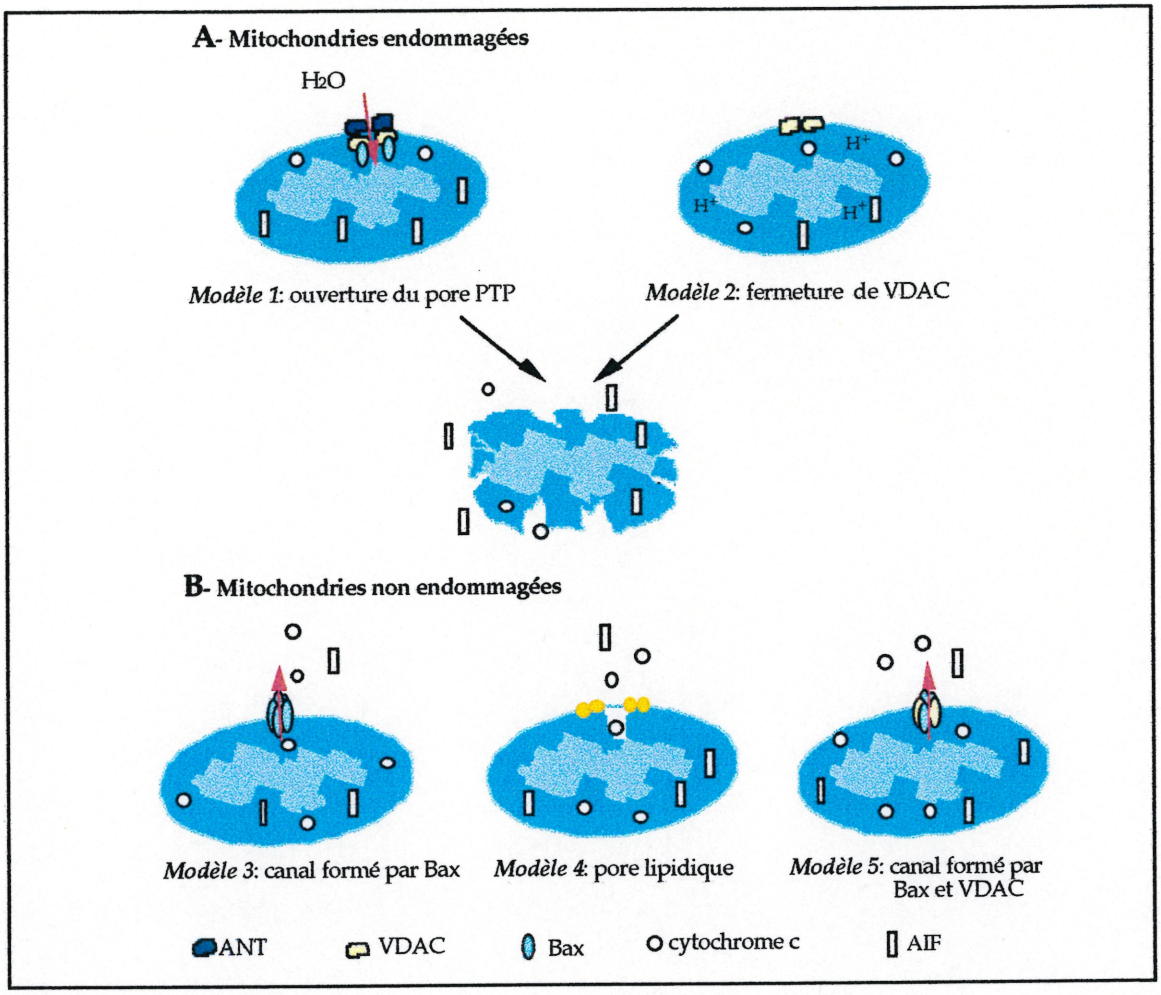


Figure 3 - Différents modèles expliquant le relargage des facteurs mitochondriaux (d'après Martinou *et coll.*, 2000)

Le point de non-retour sur le voies conduisant à l'apoptose, celui au delà duquel il n'est plus possible de sauver la cellule, est encore controversé. Pour certains, il se situe en amont de la mitochondrie et de l'activation des caspases (Amarante-Mendes *et coll.*, 1998; Brunet *et coll.*, 1998). Pour d'autres, c'est la mitochondrie elle-même puisqu'elle joue un rôle important dans la régulation de l'activation des caspases (Kroemer *et coll.*, 1998). C'est un point important puisque seuls les mécanismes régulateurs intervenant en amont de ce point seront capables de moduler la sensibilité des cellules tumorales aux agents cytotoxiques.

1.2.4 - La phase d'exécution :

La notion d'apoptosome : Le cytochrome c libéré de l'espace intermembranaire mitochondrial provoque la formation, dans le cytosol, d'un complexe multimérique (Apaf-1, procaspase-9, cytochrome c, ATP) dénommé apoptosome (Green *et coll.*, 1998, pour revue). En présence d'ATP, le cytochrome c provoque un changement de conformation d'Apaf-1 qui s'oligomérise et recrute des molécules de procaspase-9. Au sein de l'apoptosome, la caspase-9 est activée. Celle-ci active la caspase-3 (Zou *et coll.*, 1997), provoquant une cascade protéolytique conduisant à l'apoptose (pour détails, voir sous paragraphe 1.3.4.1).

L'apoptosome chez *C. elegans* : Cet apoptosome a été identifié chez le nématode *Caenorhabditis elegans* : il est alors composé de CED-3 (homologue des procaspases), de CED-4 (homologue d'Apaf-1) et de CED-9 (homologue de la sous-famille Bcl-2) au niveau de la mitochondrie (Chinnaiyan *et coll.*, 1997). En réponse à un signal apoptotique, EGL-1 (homologue de la sous-famille BH-3) va s'associer avec CED-9, libérant le complexe CED-4/CED-3. En présence d'ATP, CED-3 est activée et déclenche l'apoptose (Hengartner, 1998; Chaudhary *et coll.*, 1998) (Figure 4).

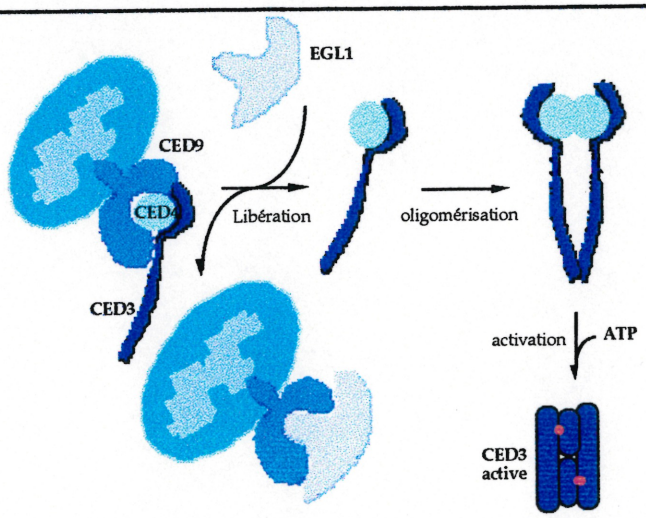


Figure 4: - Modèle de l'apoptosome chez *Caenorhabditis elegans* (d'après Hengartner, 1998).

Le clivage des protéines intracellulaires : Les caspases activées clivent un nombre limité (évalué à une centaine) de protéines intracellulaires. Ce clivage a des conséquences très variables selon la cible qu'il active ou inhibe. L'activation de la cible peut être la conséquence du clivage d'un inhibiteur qui lui est associé ou de son propre clivage. Prenons 4 exemples :

1 - Le clivage de Bcl-2, protéine anti-apoptotique, par une caspase élimine son domaine BH4 et génère une protéine pro-apoptotique (Cheng *et coll.*, 1997).

2 - Le clivage de la protéine inhibitrice ICAD ("Inhibitor of **CAD**")/DFF-45 par la caspase-3 (Enari *et coll.*, 1998; Sakahira *et coll.*, 1998; Liu *et coll.*, 1997) libère la nucléase basique CAD/DFF-40 qui migre dans le noyau et provoque la fragmentation internucléosomale de l'ADN.

3 - Le clivage de la lamine B par la caspase-6 conduit au désassemblage de l'enveloppe nucléaire (Rao *et coll.*, 1996).

4 - Le clivage de l'inhibiteur du cycle cellulaire $p27^{Kip1}$ renforce son activité anti-apoptotique puisque des mutants dans lesquels les sites potentiels de clivage des caspases ont été mutés perdent cet effet protecteur (Eymin *et coll.*, 1999a et 1999b).

1.3 - Les caspases :

Les caspases ("Cysteinyl aspartate-specific proteinase") sont des enzymes synthétisées sous forme de zymogènes qui doivent être clivées pour devenir actives. Ce clivage se fait du côté carboxy-terminal de résidus aspartate et provoque la libération d'un prodomaine de taille très variable, de deux sous-unités qui s'hétérodimérisent et, parfois, d'un domaine de liaison entre la grande et la petite sous-unité. La grande sous-unité (17-21 kDa) contient la cystéine catalytique au niveau du site commun actif QACXG. La petite sous-unité (10-14 kDa) détermine la spécificité vis à vis du substrat. Les dimères s'associent pour former l'enzyme active sous forme d'un tétramère. Les études structurales des caspases-1 et -3 actives suggèrent que la forme mature de l'enzyme est un hétérotétramère composé de deux hétérodimères (Figure 5) (Wilson *et coll.*, 1994; Walker *et coll.*, 1994; Rotonda *et coll.*, 1996; Mittl *et coll.*, 1997). unité

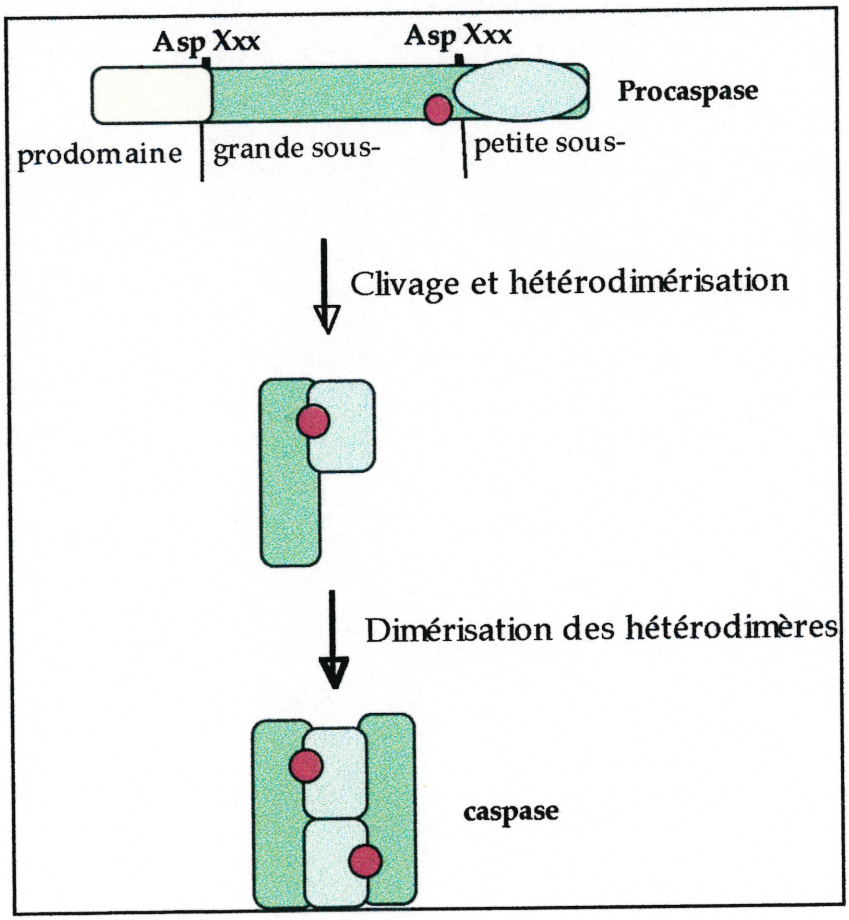


Figure 5 - Schéma général d'activation des procaspases

1.2.1 - Les caspases sont des enzymes très conservées au cours de l'évolution :

L'apoptose est une mort cellulaire observée dans le règne végétal (Greenberg, 1996) et dans le règne animal (Shaham & Horvitz, 1996), chez les organismes unicellulaires comme l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Cornillon *et coll.*, 1994) et chez les procaryotes. Les principales enzymes impliquées dans ce mécanisme sont aussi conservée au cours de l'évolution. Nous prendrons 3 exemples très étudiés :

Caenorhabditis elegans **:** Les travaux d'Horvitz ont permis d'identifier les composants essentiels de l'apoptose observée au cours du développement de ce nématode. Onze gènes sont impliqués dans la régulation de la mort cellulaire programmée chez *C. elegans*, dont trois (*ced-3*, *ced-4* et *ced-9*) jouent un rôle central. Les mutations de *ced-3*, qui code pour une enzyme protéolytique de 56 kDa, provoquent le maintien de presque toutes les cellules qui devraient normalement disparaître au cours du développement (Ellis *et coll.*, 1991, pour revue) tandis que la surexpression de *ced-3* induit l'apoptose des cellules transfectées. La protéine CED3 est l'homologue de l'enzyme de conversion de l'interleukine-1ß (ICE), première caspase identifiée chez l'homme (procaspase-1) (Thornberry *et coll.*, 1992). Récemment, 3 nouveaux gènes apparentés aux gènes des caspases, *csp-1*, *csp-2* et *csp-3* , ont été identifiés (Shaham, 1998). Ces trois gènes codent pour six protéines correspondant à une proenzyme (CSP-1A, CSP-1B, CSP-2A, CSP-2B), à une grande sous-unité (CSP-1C) ou à une petite sous-unité (CSP-3). CSP-1B peut s'autoactiver et activer CED-3 et CSP-2B. CED-3 peut s'autoactiver et activer CSP-2B. Ces résultats suggèrent que *C. elegans* possède plusieurs caspases dont l'activation en cascade déclenche l'apoptose (Shaham, 1998).

Drosophila melanogaster *:* Six homologues des caspases ont été identifiés chez la drosophile (Kumar, 1999, pour revue):

- DCP-1 (Song *et coll.*, 1997) est structurellement et biochimiquement semblable à CED-3. Une mutation perte de fonction dans *Dcp-1* induit la

mort des larves et la formation de mélanomes.

- DRICE (Fraser *et coll.*, 1997) : Sa déplétion inhibe l'apoptose induite par la surexpression d'autres homologues des caspases, suggérant qu'il s'agit d'une caspase effectrice.
- DREDD (Chen *et coll.*, 1998) possède deux domaines DEDs (*"Death Effector Domains "*), suggérant une caspase initiatrice.
- DRONC (Dorstyn *et coll.*, 1999a) possède un domaine CARD (*"CAspase Recruitment Domain"*), suggérant une caspase initiatrice. Elle peut être induite par l'ecdysone.
- DECAY (Dorstyn *et coll.*, 1999b) a une forte homologie de séquence avec les caspases-3 et -7 humaines
- DAMM (Kumar, 1999) n'a pas encore été décrite dans le détail.

Un homologue de CED4/Apaf-1, HAC-1, a également été identifié (Zhou *et coll.*, 1999). Il est probable que les homologues des caspases chez la drosophile forment aussi une cascade protéolytique.

Xenopus laevis. L'hormone thyroïdienne cause la transformation du têtard en grenouille. Pendant cette métamorphose, les ouïes et la queue disparaissent. Il existe au moins six caspases chez le Xénope. Les homologues des caspases-1 et -3 ont d'abord été identifiés (Yaoita & Nakajima, 1997). Dans ce modèle, l'expression de l'homologue de la caspase-3 est induite par l'hormone thyroïdienne qui n'a pas d'effet sur l'expression de l'homologue de la caspase-1. Les homologues des caspases-2, -6, -8 et -10 ont ensuite été identifiés. L'ARN messager de ces différentes caspases s'accumule au cours de la métamorphose des amphibiens dans les organes qui vont disparaître mais leur expression ne semble pas influencée par l'hormone thyroïdienne (Nakajima *et coll.*, 2000).

Mammifères : Quatorze caspases ont été identifiées chez les mammifères (Thornberry & Lazebnik, 1998). Parmi elles, onze ont été clonées chez l'homme tandis que les caspases-11, -12 et -14 n'ont été identifiées que chez la souris (Wang *et coll.*, 1996; Van de Craen *et coll.*, 1997). Si les caspases sont conservées au cours de l'évolution, la machinerie de la mort cellulaire est plus complexe dans les organismes supérieurs.

1.3.2 - Les leçons de l'invalidation génique :

Pour déterminer le rôle de chacune de ces enzymes chez les mammifères, le gène d'un certain nombre de ces caspases (-1, -2, -3, -8, -9, -11, -12) a été invalidé chez la souris (Zheng *et coll.*, 1999, pour revue).

Caspases-1 et -11 (Kuida *et coll.*, 1995; Li *et coll.*, 1995; Wang et *coll.*, 1998) : Ces souris se développent normalement mais la production de certaines cytokines (IL-1, IL-18, Interféron gamma) est défectueuse et les animaux présentent une résistance accrue au choc septique. Les cellules ont une sensibilité normale à la plupart des stimuli apoptotiques. On note toutefois une atténuation de la réponse à Fas-L dans les thymocytes et une résistance des neurones à l'apoptose induite par la privation de facteurs de croissance.

Caspase-2 (Bergeron *et coll.*, 1998) : Ces souris se développent normalement. Elles présentent un excès de cellules germinales femelles, conséquence d'une résistance des ovocytes à l'apoptose. Il existe également un défaut de réponse des lymphocytes B au granzyme B. Enfin, le déficit en motoneurones faciaux renforce l'hypothèse d'une double fonction de la caspase-2 en fonction des isoformes synthétisées (Wang *et coll.*, 1994).

Caspase-3 (Kuida *et coll.*, 1996, Woo *et coll.*, 1998) : Les animaux, de petite taille à la naissance, présentent essentiellement des altérations du développement cérébral (hyperplasie). Ils meurent entre la première et la troisième semaine de vie. Des défauts de l'apoptose ont été identifiés dans les thymocytes, les hépatocytes et les fibroblastes mais dépendent du stimulus utilisé. La caspase-3 semble indispensable à la fragmentation internucléosomale de l'ADN et à la condensation de la chromatine mais ne semble pas impliquée dans l'externalisation de la phosphatidylsérine ou le clivage de la poly(ADP-ribose)polymérase.

Caspase-8 (Varfolomeev *et coll.*, 1998) : La délétion génique est létale pour l'embryon. On observe des malformations cardiaques, l'accumulation

d'érythrocytes, une réduction des cellules souches hématopoïétiques et une résistance à l'apoptose des fibroblastes embryonnaires au stimuli impliquant les récepteurs à domaine de mort.

Caspase-9 (Hakem *et coll.*, 1998; Kuida *et coll.*, 1998) : La délétion génique est létale en période périnatale du fait de malformations cérébrales analogues à celles observées chez les souris caspase-3 -/- et Apaf-1 -/-. Les cellules ES, les fibroblastes et les thymocytes résistent à l'apoptose induite par les agents endommageant l'ADN ou la dexaméthasone mais restent sensibles à l'apoptose induite par les ultraviolets ou Fas-L, tandis que les splénocytes restent sensibles à l'apoptose induite par les agents cytotoxiques. Le cytochrome c est incapable d'activer la caspase-3 dans un système acellulaire.

Caspase-12 (Nakagawa *et coll.*, 2000) : Ces souris se développent normalement mais les cellules résistent à l'apoptose induite par des agents ciblant le réticulum endoplasmique (tunicamycine) et les neurones sont moins sensibles à l'apoptose induite par la protéine amyloide ß.

Les souris caspase-6-/- se développent normalement (Zheng & Flavell, données non publiées, Zheng *et coll.*, 1999, pour revue) tandis que les souris caspase-7-/- meurent pendant le développement embryonnaire (Kuida & Flavell, données non publiées, Zheng *et coll.*, 1999, pour revue). Aucune des invalidations géniques n'inhibe totalement l'apoptose dans toutes les cellules. Il existe une certaine spécificité tissulaire, démontrée par la nécessité de la voie caspase-9 / caspase-3 pour de développement cérébral et de la caspase-8 pour la formation du muscle cardiaque ou l'hématopoïèse. Il existe également une spécificité des caspases en fonction du stimulus.

1.3.3 - Classifications des caspases :

Classification phylogénétique : En se basant sur les homologies de séquence entre les différentes caspases, on peut identifier trois sous-familles (Nicholson, 1999, pour revue). La première regroupe les caspases s'apparentant à ICE/caspase-1 (caspases-1, -4/-11, -5, -12 et -13). La caspase-11

est probablement l'homologue murin de la caspase-4 humaine. La deuxième regroupe les homologues de la caspase-3 (caspases-3, -6, -7, -8 et -10) tandis que la dernière regroupe les homologues de la caspase-2 (caspases-2, -9 et -14) (Figure 6).

Classification en fonction des substrats : Au cours de l'apoptose, une fraction des protéines cellulaires est clivée par les caspases. Des estimations basées sur une analyse comparative en gel deux dimensions entre cellules saines et cellules apoptotiques suggèrent que le nombre de protéines clivées est de 100 à 200 (Brockstedt *et coll.*, 1998). Par exemple, un des premiers substrats identifiés, la poly(ADP)polymérase (PARP), a permis de mettre en évidence l'importance de l'activation séquentielle de ces protéases dans les différentes voies apoptotiques (Lazebnik *et coll.*, 1994; Tewari *et coll.*, 1995a). Depuis, plus de 70 de ces protéines cibles des caspases ont été identifiées (Tableau II). Elles sont impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires, dont la réparation de l'ADN (PARP), le cycle cellulaire ($p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$), le cytosquelette (fodrines, gelsoline, actine), la structure du noyau (lamines), l'inhibition de l'apoptose (Bcl-2, Bcl-X_L) ou l'induction de l'apoptose (Bid, RIP).

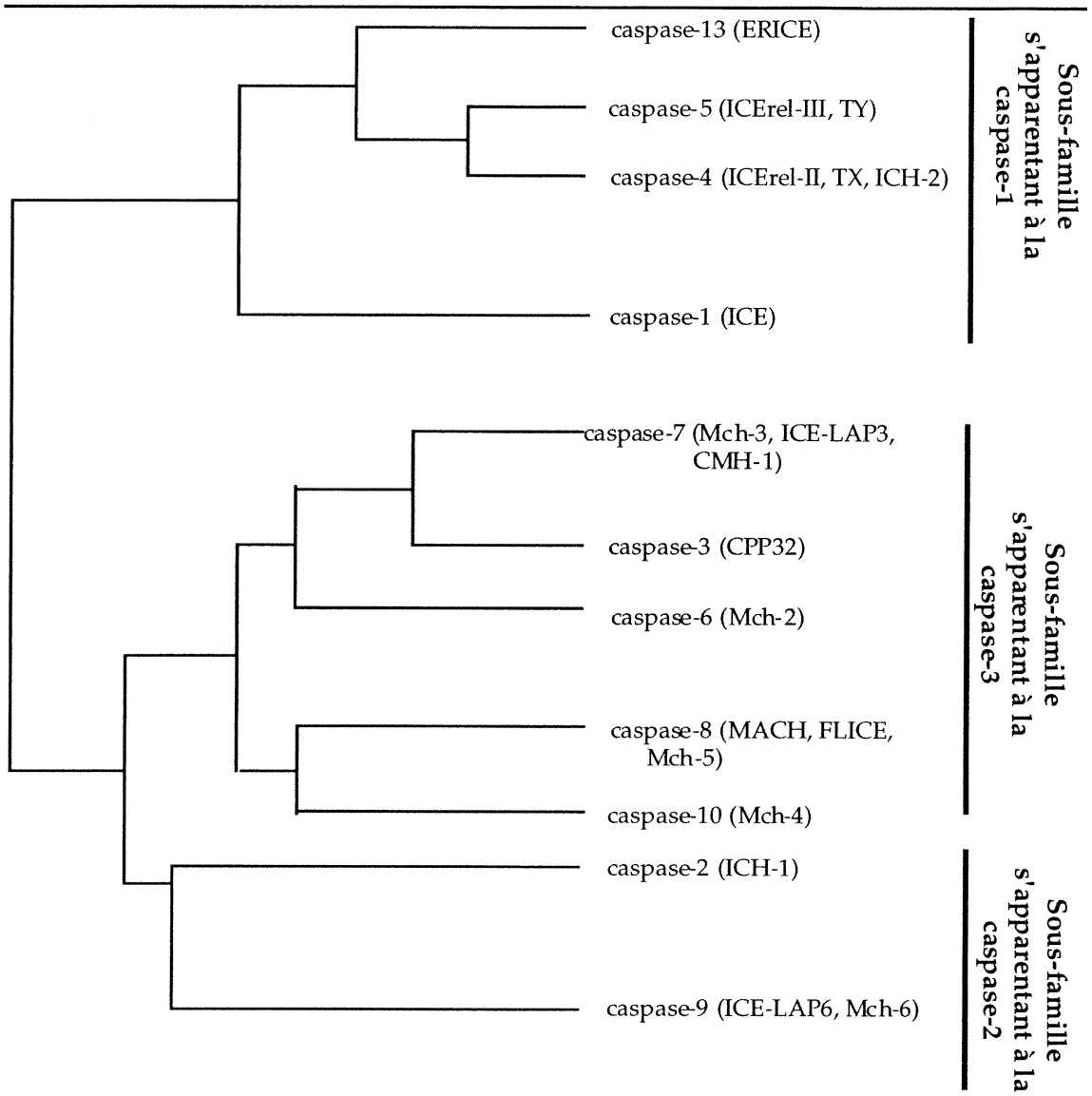


Figure 6: Analyse phylogénétique de la famille des caspases humaines (d'après Nicholson, 1999). Les homologues humains des caspases-11, -12 et -14 murines n'ont pas encore été identifiés.

site de clivage

	P4 P3 P2	P1	
Groupe I	**Hydrophobe**		Caspases-1, -4, -5, -13
Groupe II	**Asp Glu Xxx**	**Asp**	Caspases-2, -3, -7, CED3
Groupe III	**Aliphatique**		Caspases-6, -8, -9, -10

Figure 7 - Classification des différentes caspases humaines en fonction de leur spécificité de clivage (d'après Nicholson, 1999)

Les caspases reconnaissent un motif tétrapeptidique P4 P3 P2 P1 où la position P1 est un résidu aspartate. En utilisant une banque de combinaison positionnelle de peptides, les caspases ont été classées en trois sous-groupes, (Figure 7). La position P2 peut être occupée par différents acides aminés. La position P3 est le plus souvent un résidu glutamate. L'élément déterminant de la spécificité de substrat est l'acide aminé en position P4 (Tableau II) :

- Les caspases du groupe I (caspases-1,-4,-5,-13) préfèrent des acides aminés hydrophobiques (tryptophane, tyrosine) retrouvés au niveau des procytokines mais pas des protéines clivées au cours de l'apoptose.

- Les caspases du groupe II (caspases-2,-3,-7) préfèrent un résidu aspartate. Ce motif DEXD est un motif très conservé puisque reconnu par CED-3 et majoritairement retrouvé au niveau des protéines clivées lors de l'apoptose.

- Les caspases du groupe III (caspases-6, -8, -9 et -10) préfèrent les acides aminés aliphatiques (valine, leucine). Ces séquences sont observées au niveau des sites de maturation des caspases des groupes II et III, ce qui s'accorde avec l'hypothèse d'une cascade protéolytique impliquant des caspases initiatrices (groupe III) capables de s'autoactiver et d'activer des caspases effectrices (groupe II).

Il existe cependant deux exceptions puisque la caspase-6 (groupe III) se comporterait comme une caspase effectrice en clivant spécifiquement les lamines (Rao *et coll.*, 1996) tandis que la caspase-2 (groupe II) a la structure d'une caspase initiatrice. Le site de reconnaissance de la caspase-12, dont l'homologue humain est inconnu, n'est pas encore identifié.

Classification en fonction de la longueur du prodomaine : Les précurseurs inactifs des caspases ont un prodomaine amino-terminal de longueur variable (Tableau III) (Kumar, 1999, pour revue).

Site de clivage DXXD			Site autre que DXXD		
Site		Protéine clivée	Site		Protéine clivée
DEVD	G	PARP	MELD	G	STAT1
DEVD	N	DNA-PKcs	NSPD	A	Sp-1
DVLD	N	Rad51	SELD	A	SRP p72
DELD	Y	Acinus	VFTD	L	NF-κB
DETD	S	DFF45/ICAD siteI	YVPD	S	PITSLRE Kinase
DAVD	T	DFF45/ICAD siteII	SHVD	G	PAK-2
DEVD	G	DNA-RFC140	EERD	G	$p59^{FYN}$
DEAD	G	Rb	PAPD	A	CaMK-IV
DVPD	C	HDM2/MDM2	AAVD	G	p28 Bap31
DHVD	L	$p21^{CIP1/WAF-1}$	ELPD	G	Actine
DSLD	L	NuMA	SRVD	G	Gas2
DYPD	S	ATM	VEID	N	Lamine A
DGPD	G	U1-70K snRNP	VEVD	N	Lamine B
DXXD	X	hnRNP-C1/C2	HLAD	S	Bcl-XL
DEPD	S	SREBP	LQTD	G	BID
DRGD	S	IκB-α	VEVD	A	β-APP
DELD	S	D4-GDI	SSTD	S	proIL-16
DELD	A	$cPLA_2$	XXXD	X	procaspases
DMQD	N	PKC δ			
DEVD	K	PKC θ	Site de clivage inconnu		
DGVD	G	PKC ζ			
DTVD	G	MEKK-1	XXXD	X	MCM3
DEMD	S	Mst-1	XXXD	X	$p27^{KIP-1}$
DITD	C	PRK2	XXXD	X	Wee1
DEQD	S	PP2A	XXXD	X	CDC27
DQTD	T	FAK	XXXD	X	SAF-A/hnRNP-U
DETD	S	αII-Fodrine	XXXD	X	hnRNP-A1
DEVD	S	βII-Fodrine	XXXD	X	RasGAP
DQTD	G	Gelsoline	XXXD	X	Raf1
DALD	S	Cytokeratine-18	XXXD	X	Akt1
DXXD	X	LAP2	XXXD	X	Cbl
DITD	F	Nup153	XXXD	X	Cbl-b
DESD	F	Rabaptine-5	XXXD	X	PKN
DNID	N	APC	XXXD	X	β-, γ-Catenines
DEED	D	Hsp90	XXXD	X	Kinectine
DQPD	A	UbqCE NEDD4	XXXD	X	Calpastatine
DAGD	V	Bcl-2	XXXD	X	Ataxine-3
DSYD	S	Preseniline 2	XXXD	X	Récepteur AMPA
DXXD	X	Huntingtine	XXXD	X	RIP
DEDD	S	SBMA-AR			
DSLD	G	Atrophine-1			

Tableau II: Liste incomplète des substrats clivés par les caspases pendant l'apoptose (d'après Nicholson, 1999)

On distingue :

- **les procaspases avec un prodomaine long** qui permet des interactions protéine-protéine jouant un rôle important dans leur activation en permettant leur interaction avec des protéines adaptatrices (FADD, Apaf-1, RAIDD) et leur oligomérisation au niveau de complexes multiprotéiques (classe-I : caspases initiatrices). L'oligomérisation peut permettre leur activation par autocatalyse mais toutes ces caspases ne sont pas activées de la même façon (pour détails, voir sous paragraphe 1.3.4).
- **les procaspases avec un prodomaine court** ne peuvent s'autoactiver et nécessitent un clivage par les caspases de la classe-I pour être activées (classe-II : caspases effectrices - caspases-3, -6 et -7). Elles se situent donc en aval des précédentes dans une cascade protéolytique.

Prodomaine	Procaspase	Domaine d'interaction	Adaptateur
Long	Procaspase-1	CARD	CARDIAK
Long	Procaspase-2	CARD	RAIDD/CRADD
Court	Procaspase-3	aucun	aucun
Long	Procaspase-4	CARD	inconnu
Long	Procaspase-5	CARD	inconnu
Court	Procaspase-6	aucun	aucun
Court	Procaspase-7	aucun	aucun
Long	Procaspase-8	DED	FADD/MORT1 et FLASH
Long	Procaspase-9	CARD	Apaf-1 et NOD1/CARD4
Long	Procaspase-10	DED	FADD/MORT1
Long	Procaspase-11	CARD	inconnu
Long	Procaspase-12	CARD	inconnu
Long	Procaspase-13	CARD	inconnu
Court	Procaspase-14	aucun	aucun

Tableau III : Prodomaines et adaptateurs des procaspases.

1.3.4 - Mécanismes d'activation des caspases :

1.3.4.1 - Activation par recrutement : Dix des quatorze caspases identifiées ont un prodomaine long qui permet le recrutement de ces proenzymes dans des complexes multimoléculaires. Ce recrutement implique des molécules adaptatrices telles que FADD et Apaf-1.

- Le recrutement par FADD : Le DISC associe Fas, FADD et la procaspase-8. L'interaction de Fas avec son ligand provoque le recrutement de la procaspase-8 grâce à la molécule adaptatrice FADD (Boldin *et coll.*, 1996; Muzio *et coll.*, 1996). L'interaction entre Fas et FADD implique leur domaine de mort respectif tandis que l'interaction entre FADD et la procaspase-8 implique leur domaine effecteur de mort (DED) respectif (Ashkenazi *et coll.*, 1998, pour revue). Il existe 2 copies du DED dans le prodomaine de la procaspase-8. Un seul interagit avec le domaine DED de FADD. Le second pourrait être nécessaire à l'homodimérisation ou à la stabilisation du complexe (Medema *et coll.*, 1997). La procaspase-10 possède aussi 2 motifs DED au niveau de son prodomaine et peut être recrutée par FADD au niveau de DR4. Le recrutement de la procaspase-8 via FADD permet son activation (Figure 8). Une protéine appelée FLASH, récemment identifiée (Imai *et coll.*, 1999), serait également impliquée dans l'activation de la caspase-8 par son domaine DRD (*"Death effector Recruitment Domain"*) qui peut interagir avec les DED de FADD et de la caspase-8. FLASH possède aussi un domaine d'oligomérisation altéré apparenté à celui de CED-4 et d'Apaf-1 (Imai *et coll.*, 1999). Le mécanisme par lequel FLASH active la caspase-8 est encore inconnu.

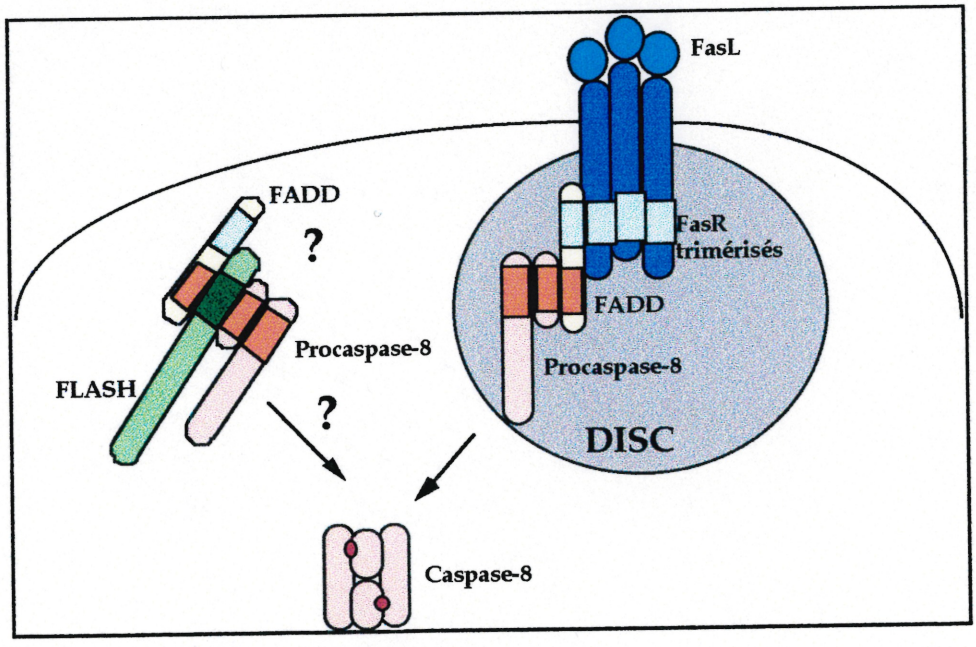


Figure 8: Activation par recrutement de la procaspase-8
domaine DD domaine DED domaine DRD
Le mécanisme d'activation par FLASH de la procaspase-8 reste encore inconnu.

- Le recrutement par Apaf-1 : Le prodomaine de plusieurs procaspases possède un motif CARD. Ce motif, présent en un seul exemplaire sur ce prodomaine, est également retrouvé au niveau de molécules adaptatrices telles que Apaf-1. Il est très conservé au cours de l'évolution puisqu'il est retrouvé au niveau de CED-3 et de son adaptateur CED-4 chez *C. elegans*, de DRONC chez la drosophile, des procaspases -2 et -9 humaines et de leurs adaptateurs RAIDD et Apaf-1 (Kumar, 1999, pour revue; Chinnaiyan *et coll.*, 1997; Li *et coll.*, 1997; Chaudhary *et coll.*, 1998).

La caspase-9 ne semble pas pouvoir s'autoactiver (le domaine CARD de la procaspase-9 ne s'homodimérise pas chez la levure). L'interaction procaspase-9/Apaf-1 permet l'activation de la caspase-9. Apaf-1 contient, dans sa région carboxy-terminale, de nombreux motifs WD40 qui, en l'absence de stimulus apoptotique, préviennent l'interaction Apaf-1/procaspase-9. Le cytochrome c, en présence d'ATP, provoque des changements conformationnels d'Apaf-1 qui s'oligomérise pour former un octamère (Zou *et coll.*, 1999), expose son domaine amino-terminal CARD, lequel interagit avec le domaine CARD de la procaspase-9 (Hu *et coll.*, 1999) (Figure 9). La délétion de la région WD40 active constitutivement Apaf-1 qui active alors la procaspase-9 (Hu *et coll.*, 1998; Adrain *et coll.*, 1999).

La protéine CARD4/NOD1 peut aussi interagir avec la procaspase-9 et l'activer (Bertin *et coll.*, 1999; Inohara *et coll.*, 1999). CARD4/NOD1 contient un domaine CARD, une séquence se liant aux nucléotides et une région carboxy-terminale riche en leucine. Cette protéine peut également induire NFκB. Cependant, son rôle dans l'activation de la procaspase-9 reste mal défini.

Le clivage de la procaspase-9 ne serait pas indispensable à son activation. Une procaspase-9 dont les sites de clivage sont mutés est toujours capable d'activer les caspases effectrices en présence de facteurs cytosoliques. Une hypothèse est que la liaison d'un facteur cytosolique tel qu'Apaf-1 à la procaspase-9 provoque un changement de conformation qui l'active (Stennicke *et coll.*, 1999).

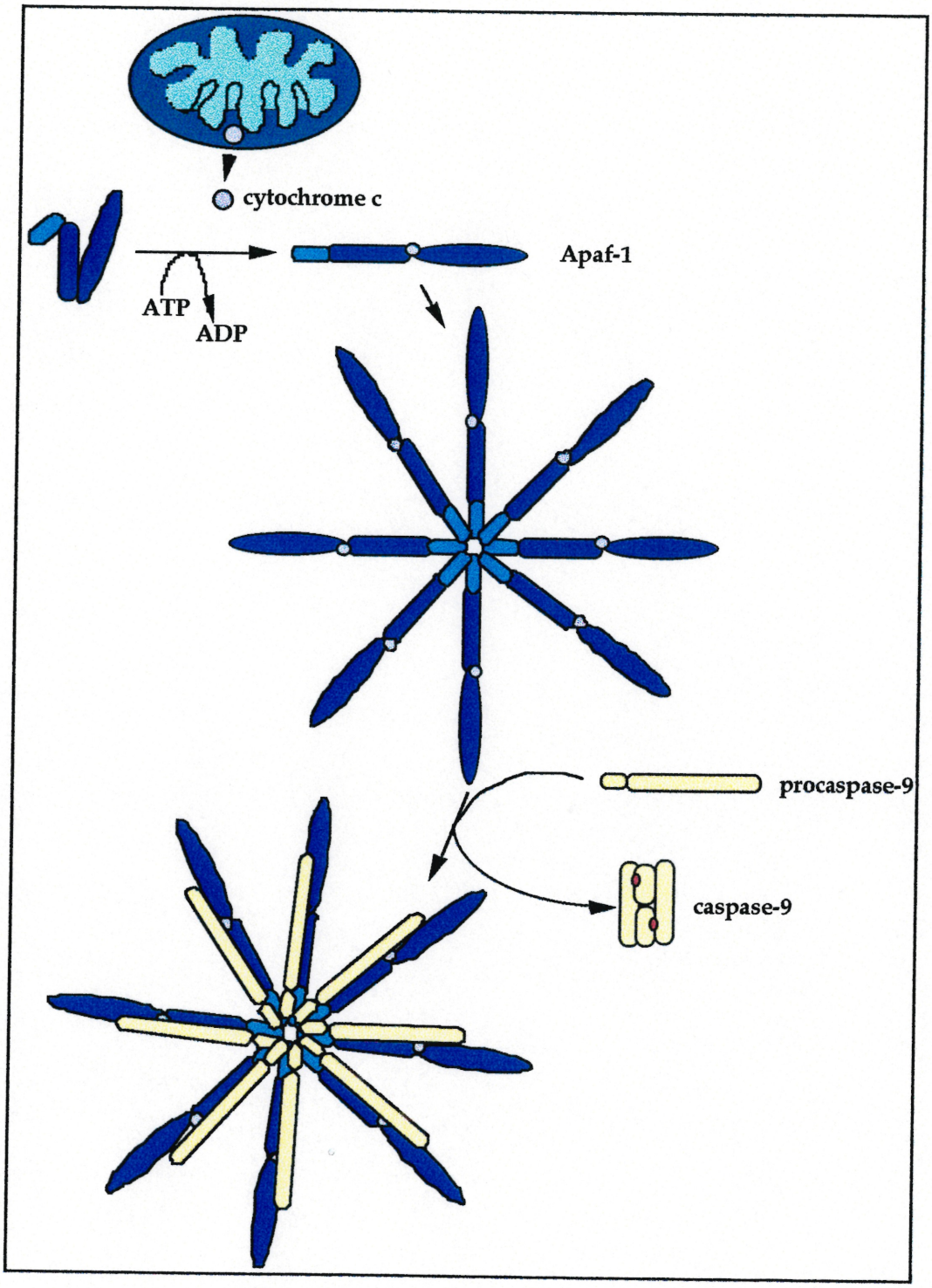


Figure 9: - Modèle d'activation de la procaspase-9 (d'après Zou *et coll.*, 1999)

Le recrutement par CARDIAK : La procaspase-1 est recrutée par CARDIAK / RIP2 / RICK et serait activée (Thome *et coll.*, 1998; McCarthy *et coll.*, 1998; Inohara *et coll.*, 1998a). La surexpression de CARDIAK induit aussi l'activation de NFκB via son interaction avec TRAF-1, TRAF-2, TRAF-5 et TRAF-6, eux-mêmes associés au récepteur du TNF. Il reste à déterminer si l'interaction CARDIAK / procaspase-1 est vraiment nécessaire à l'activation de cette dernière, par exemple en stabilisant des oligomères de procaspase-1 avant l'activation.

1.3.4.2. - Transactivation des caspases : La transactivation d'une caspase par une autre est le second mécanisme bien établi pour la maturation et l'activation de ces proenzymes. En général, les caspases initiatrices situées en amont de la cascade protéolytique telles les caspases-8 et -9 clivent et activent

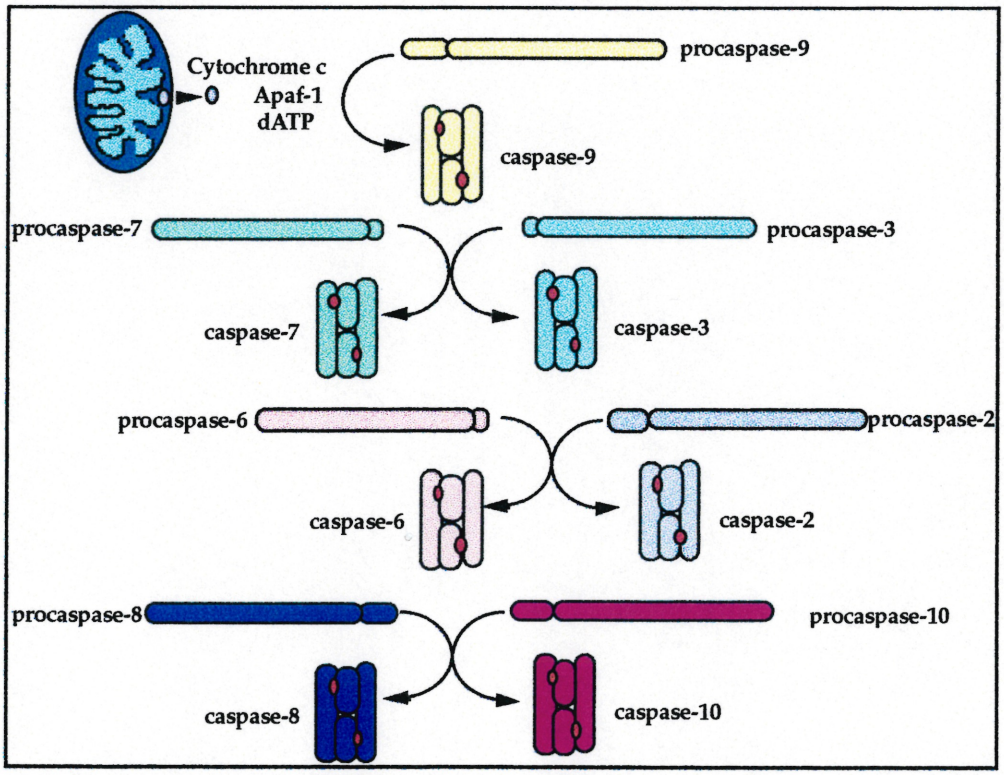


Figure 10: Ordre de transactivation des procaspases en présence de cytochrome c et de dATP en utilisant des extraits cytosoliques des cellules Jurkat (d'après Slee *et coll.*, 1999).

les procaspases effectrices. Dans la voie Fas, la caspase-8 activée, à condition qu'elle soit produite en quantité suffisante (cellules de type I; Scaffidi *et coll.*, 1998), active la caspase-3 en clivant la proenzyme. Dans un système

acellulaire établi à partir de cellules Jurkat, le cytochrome c, en présence d'ATP ou de dATP, induit l'activation de la caspase-9 (via Apaf-1) qui active alors en parallèle la caspase-7 et la caspase-3. La caspase-3 active à son tour les caspases-2 et -6. La caspase-6 active les caspases-8 et -10 (Figure 10) (Slee et coll., 1999). Dans un système analogue établi à partir de cellules HL-60, le cytochrome c active les caspases-3, -6, et -7 mais pas les caspases-2 et -8 (Mesner et coll., 1999). L'ordre de la cascade protéolytique ainsi que les différentes caspases impliquées dépendent donc, entre autres facteurs, du type cellulaire.

La protéine chaperone Hsp60, libérée de la mitochondrie dans le cytosol avec les molécules pro-apoptotiques, semble accélérer la maturation de la procaspase-3 en présence des caspases initiatrices (caspases-8 et -9) et d'ATP (Xanthoudakis *et coll.*, 1999) ce qui suggère qu'un changement conformationnel de la forme zymogène des caspases précède leur activation.

1.3.4.3. - Auto-activation : En principe, les caspases peuvent aussi subir une activation autocatalytique. Une des indications de ce mécanisme est l'activation de la caspase-3 en présence de peptides arginine-glycine-aspartate (RGD) (Buckley *et coll.*, 1999). Un aspartate-aspartate-méthionine (DDM) pouvant lier le motif RGD a été identifié sur la procaspase-3 à proximité du site de clivage produisant les sous-unités actives p12 et p17. En se basant sur le fait que l'interaction RGD-DDX induit l'activation des intégrines (Ruoslahti, 1996, pour revue), on peut penser que l'interaction RGD-DDM de la procaspase-3 induit un changement conformationnel qui provoque alors son autoclivage et son activation (Figure 11). De tels motifs sont également présents dans d'autres procaspases telles les procaspases-1, -7 et -8 (Figure 12). Des expériences complémentaires sont nécessaires pour savoir s'il s'agit d'un mécanisme conservé d'auto-activation de certaines caspases.

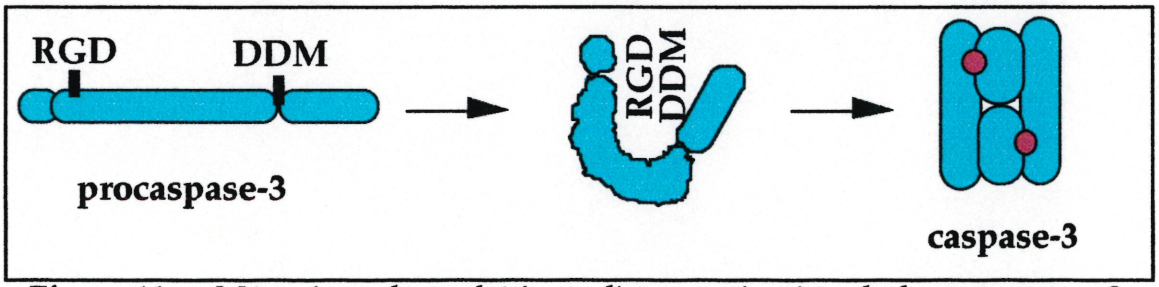


Figure 11: Mécanisme hypothétique d'auto-activation de la procaspase-3.

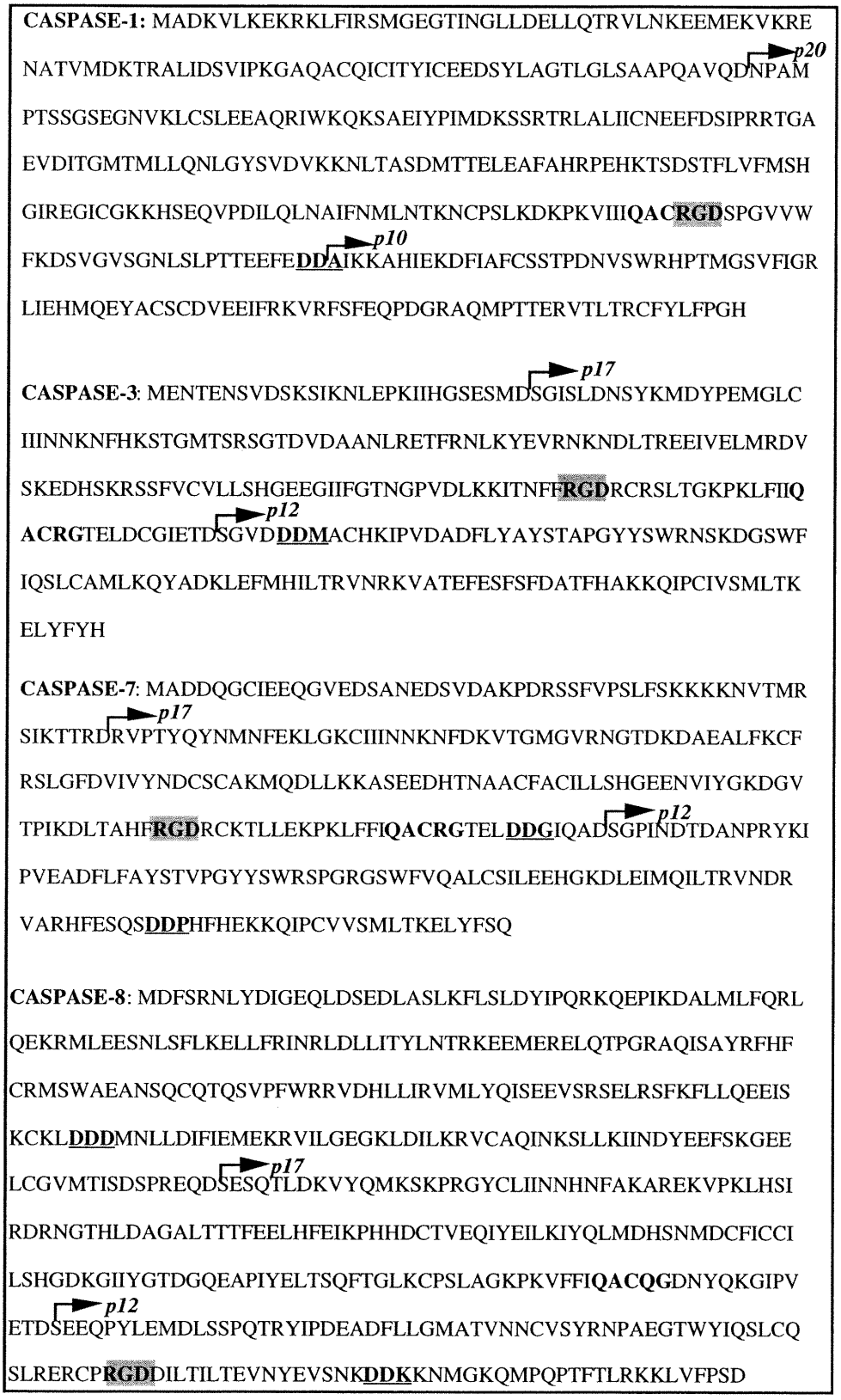


Figure 12: Séquence en acides aminés des procaspases ayant des motifs RGD et DDX. Le site actif commun conservé QACXG est représenté en caractères gras. Les sous-unités actives sont délimitées par des flèches. Les motifs RGD sont encadrés tandis que les motifs DDX sont soulignés.

1.3.5 - Régulation de l'activité des caspases :

Les isoformes courtes des caspases : Chaque gène *CASP* semble générer plusieurs isoformes (Annexe I). Le rôle de chaque isoforme n'est pas encore bien déterminé mais il semble que les isoformes courtes jouent un rôle dans la régulation des caspases. Par exemple, un épissage alternatif du messager *CASP9* génère la caspase-9b correspondant au domaine CARD intact et à la petite sous-unité de la procaspase-9 (Seol *et coll.*, 1999; Srinivasula *et coll.*, 1999). La surexpression de cette caspase-9b inhibe différentes formes d'apoptose, incluant, dans certaines cellules, l'apoptose dépendant des récepteurs de mort cellulaire. La caspase-9b agirait par compétition avec la procaspase-9 au niveau du site d'interaction avec Apaf-1 et interférerait avec la formation de l'apoptosome (Figure 13).

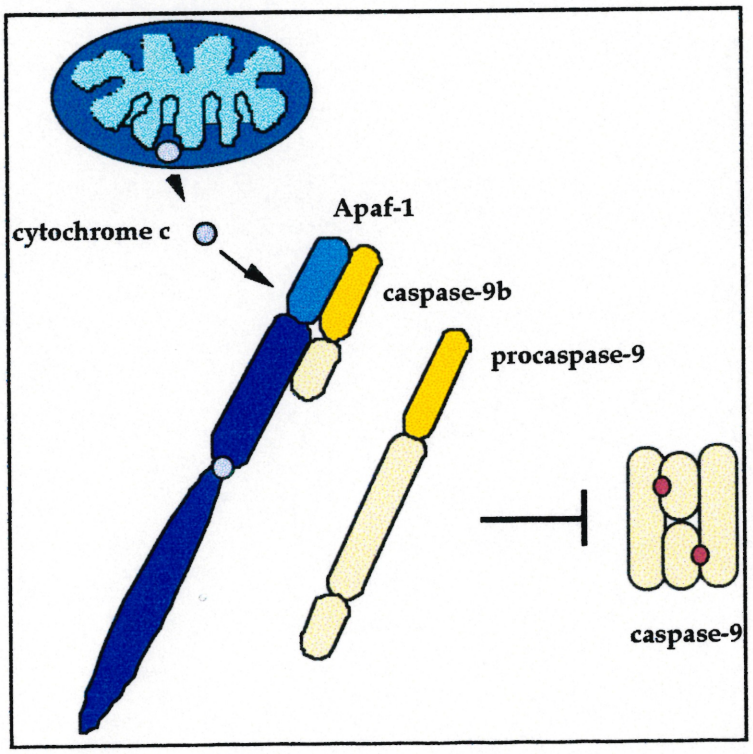


Figure 13: - Mécanisme d'inhibition de la caspase-9b

Les FLIPs (*"FLICE Inhibitor Proteins"*) **:** En 1997, des protéines virales s'apparentant aux procaspases-8 et -10 (elles possèdent deux domaines DEDs dans leur région amino-terminale) ont été identifiées (Thome *et coll.*, 1997; Hu *et coll.*, 1997; Bertin *et coll.*, 1997). Leur surexpression inhibe l'activation de la procaspase-8 en bloquant son recrutement au niveau de FADD. Un

homologue cellulaire des v-FLIPs a été identifié et dénommé c-FLIP (Irmler *et coll.*, 1997), CASH (Goltsev *et coll.*, 1997), Casper (Shu *et coll.*, 1997), CLARP (Inohara *et coll.*, 1997a), FLAME (Srinivasula *et coll.*, 1997), I-FLICE (Hu *et coll.*, 1997), MRIT (Han *et coll.*, 1997) et Usurpin (Rasper *et coll.*, 1998). Il existe plusieurs isoformes de *c-FLIP* dont deux sont exprimées dans différents types cellulaires: la forme longue de 55 kDa et la forme courte de 27/28 kDa (Irmler *et coll.*, 1997; Shu *et coll.*, 1997; Rasper *et coll.*, 1998). La forme courte de c-FLIP ressemble structurellement à v-FLIP alors que la forme longue est proche de la procaspase-8. Cependant, la grande sous-unité à la particularité de ne pas avoir de cystéine catalytique au niveau du site actif. Le rôle physiologique des protéines c-FLIPs est très controversé. Certaines équipes décrivent une fonction pro-apoptotique de ces molécules lorsqu 'elles sont surexprimées de manière transitoire (Goltsev *et coll.*, 1997; Shu *et coll.*, 1997; Inohara *et coll.*, 1997; Han *et coll.*, 1997) tandis que d'autres décrivent un effet anti-apoptotique (Irmler *et coll.*, 1997; Goltsev *et coll.*, 1997; Srinivasula *et coll.*, 1997; Hu *et coll.*, 1997; Rasper *et coll.*, 1998). L'interaction de c-FLIP avec FADD et/ou la procaspase-8 est également controversée. L'isoforme longue de c-FLIP est prédominante dans la plupart des lignées cellulaires mais son expression basale est indépendante de l'état de résistance des différentes lignées cellulaires à l'apoptose induite par Fas (Scaffidi *et coll.*, 1999). Dans les lymphocytes T activés, cependant, c-FLIP aurait un rôle régulateur de l'apoptose induite par Fas (Perlman *et coll.*, 1999).

Les inhibiteurs viraux CrmA et p35 : Les virus ont développé de multiples stratégies pour moduler la mort apoptotique des cellules qu'ils infectent. Parmi les protéines virales interférant avec l'apoptose, deux inhibiteurs des caspases sont souvent utilisés expérimentalement. CrmA (*"**C**ytokine **r**esponse **m**odifier **A**"*), produit par le virus de la variole, peut se lier et inhiber les caspases-1 et -8, empêchant la production des interleukines matures IL-1ß et IL-18 ainsi que l'apoptose induite par les récepteurs Fas, TNF et DR3 (Los *et coll.*, 1995; Tewari & Dixit, 1995; Varfolomeev *et coll.*, 1998). Par contre, CrmA est incapable d'inhiber les caspases-3, -6 et -7 *in vivo* (Zhou *et coll.*, 1997; Garcia-Calvo *et coll.*, 1998). CrmA, qui appartient à la

famille des serpines, agit comme un pseudosubstrat. La protéine est clivée au niveau de la séquence LVAD par les caspases (Komiyama *et coll.*, 1994). Son homologue humain, PI-9, ne possède pas de résidu aspartate en P1, est donc incapable d'inhiber les caspases mais inhibe le granzyme B (Bird *et coll.*, 1998). La protéine p35, produite par le baculovirus, inhibe CED3 chez *C. elegans* et les caspases-1, -3, -6, -7, -8 et -10 humaines. Tout comme CrmA, p35 est un substrat pour les caspases (site DQMD) et le fragment clivé de p35 forme un complexe avec les caspases pour les inhiber (Zhou *et coll.*, 1998).

Les IAPs ("**I**nhibitor of **A**poptosis **P**roteins") **:** Chez l'homme, au moins sept gènes *IAP* ont été identifiés. Ils codent pour les protéines c-IAP-1, c-IAP-2, HILP, MIHA, XIAP, NAIP et Survivine (Rothe *et coll.*, 1995; Duckett *et coll.*, 1996, Liston *et coll.*, 1996; Uren *et coll.*, 1996; Ambrosini *et coll.*, 1997). Ces protéines sont composées d'un ou plusieurs domaines BIR pour "***B**aculovirus **I**AP **R**epeats*" dans leur région amino-terminale et parfois d'un domaine RING dans leur région carboxy-terminale. Ces domaines sont nécessaires à leur interaction avec d'autres protéines (Rothe *et coll.*, 1995). La surexpression des gènes *IAP* humain inhibe l'apoptose induite par différents stimuli (Duckett *et coll.*, 1996; Liston *et coll.*, 1996).

- Les protéines c-IAP-1, c-IAP-2 et XIAP sont capables d'interagir directement avec les caspases-3 et -7 *in vivo* (Deveraux *et coll.*, 1997; Roy *et coll.*, 1997) et après clivage avec la procaspase-9 pour inhiber son activation (Deveraux *et coll.*, 1999). Le domaine BIR de c-IAP-1 et c-IAP-2, seul, est suffisant à cette inhibition.
- NAIP est incapable d'inhiber les activités des caspases-1, -3, -6, -7 et -8, suggérant que NAIP inhibe l'apoptose via d'autres cibles (Roy *et coll.*, 1997).
- La survivine inhibe l'apoptose induite par la surexpression des procaspases-3 et -7 en se liant directement à ces caspases. Elle aurait aussi un rôle dans la régulation de la mitose (Reed & Reed, 1999, pour revue).

La protéine Smac/DIABLO, récemment identifiée, est libérée de la mitochondrie en même temps que le cytochrome c et s'associe à l'apoptosome. Sa fonction principale semble être de lever l'inhibition due à XIAP (Du *et coll.*, 2000; Verhagen *et coll.*, 2000).

Phosphorylation / nitrosylation : Les caspases peuvent subir des modifications post-traductionnelles. La phosphorylation / déphosphorylation et la S-nitrosylation / dénitrosylation sont deux mécanismes supplémentaires de régulation de l'activité des caspases. Akt, une sérine-thréonine kinase impliquée dans la survie cellulaire, et $p21^{Ras}$, un activateur d'Akt, induisent la phosphorylation de la procaspase-9 (Cardone *et coll.*, 1998). Dans des extraits cytosoliques préparés à partir de cellules exprimant soit Ras actif, soit Akt, l'activation de la procaspase-9 dépendant du cytochrome c est inhibée, suggérant que cette phosphorylation inhibe son clivage et son activation, même si le mécanisme exact de cette inhibition n'est pas élucidé. Il est possible que cette phosphorylation affecte la dimérisation via un mécanisme allostérique. En effet, une phosphorylation au niveau des sous-unités actives des caspases, inhibant leur activité, a été observée dans des extraits cytosoliques de cellules HL60 traitées par de l'étoposide (Martins *et coll.*, 1998). La caspase-3 peut être nitrosylée au niveau du résidu cystéine de son site actif, ce qui neutralise son activité enzymatique (Dimmeler *et coll.*, 1997). L'engagement de Fas pourrait induire la dénitrosylation du site catalytique de la procaspase-3 avant son activation (Mannick *et coll.*, 1999).

Compartimentalisation des caspases : Les caspases ne sont pas seulement localisées dans le cytosol. La procaspase-3 est localisée à la fois dans le cytosol et dans la mitochondrie. Dans certains systèmes cellulaires, la procaspase-3 serait activée dans la mitochondrie où elle cliverait Bcl-2 pour favoriser le relargage de molécules pro-apoptotiques (Cheng *et coll.*, 1997). Les procaspases-2 et -9 sont également localisées dans la mitochondrie (Susin *et coll.*, 1999b, localisation de la procaspase-2, voir sous paragraphe 1.4). La procaspase-12 murine est essentiellement localisée dans le réticulum endoplasmique (Nakagawa *et coll.*, 2000) (Figure 14). Il semble que la localisation subcellulaire des caspases varie d'un type cellulaire à l'autre. Cette localisation des caspases pourrait déterminer les substrats qu'elles clivent (Chandler *et coll.*, 1998). Les signaux de migration des caspases restent mal connus ? Les co-facteurs impliqués dans la répartition subcellulaire des caspases sont à identifier.

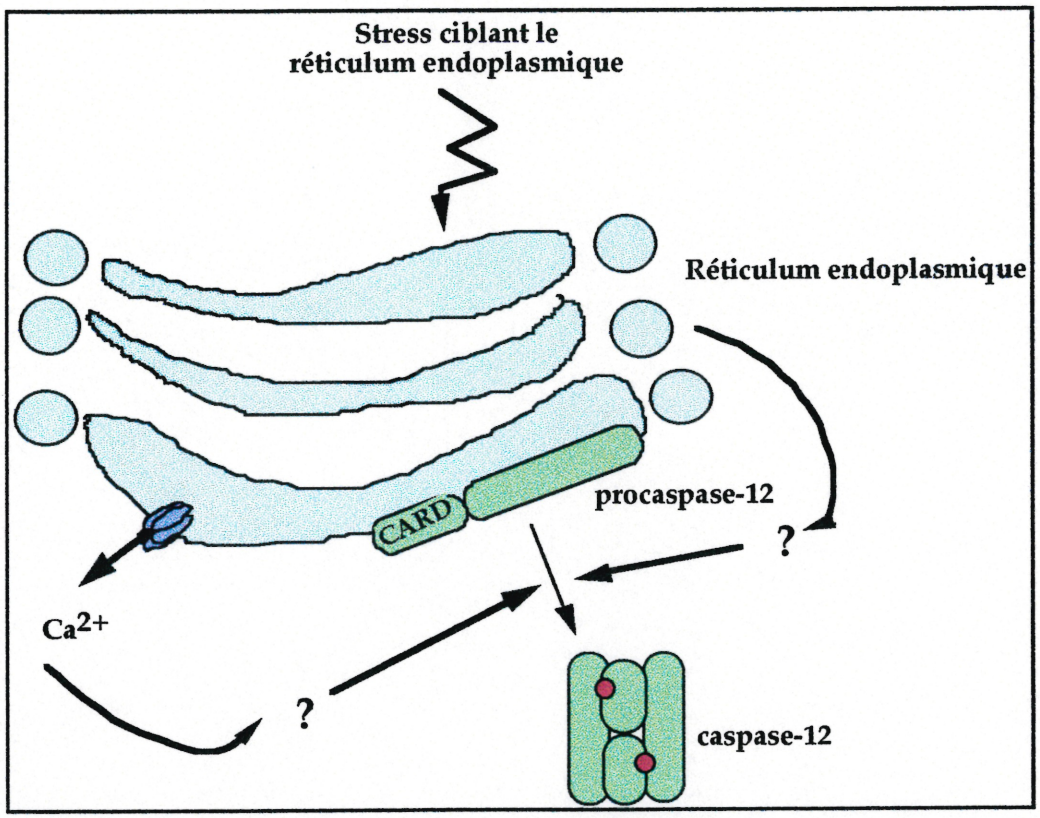


Figure 14: Exemple de régulation par la localisation subcellulaire

Les protéines de la famille Bcl-2 : Le contrôle de l'activation des caspases se fait principalement au niveau de leur recrutement et de leur oligomérisation. La famille Bcl-2, qui agit en amont de la cascade des caspases, prévient les interactions caspases / adaptateurs en modulant les événements mitochondriaux.

L'oncogène *bcl*-2 a été identifié dans les lymphomes malins non Hodgkinien d'histologie folliculaire chez l'homme. Dans ces tumeurs, la translocation chromosomique t(14;18) transfert le gène *bcl*-2 du chromosome 18 au chromosome 14 sur lequel il se trouve sous le contrôle du promoteur du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (Bakhshi *et coll.*, 1985; Tsujimoto *et coll.*, 1985; Cleary *et coll.*, 1986). La surexpression de l'oncogène *bcl*-2 s'est révélée prévenir l'apoptose de cellules dépendantes de l'IL-3 lorsqu'elles sont privées de cytokine. Cet oncogène confère donc un avantage sélectif aux cellules qui l'expriment en quantité importante en prévenant la mort cellulaire.

La protéine Bcl-2 est exprimée au niveau des membranes de la mitochondrie, du noyau et du reticulum endoplasmique. Le domaine transmembranaire de Bcl-2 lui confère une fonction optimale bien qu'une protection contre l'apoptose soit observée avec les mutants *bcl-2* tronqués. Bcl-2 retarde ou inhibe le déclenchement de l'apoptose en fonction de l'amplitude du stimulus apoptotique (Reed, 1997, pour revue).

Bcl-2 est le chef de file d'une famille de protéines ayant des fonctions anti- ou pro-apoptotiques. On dénombre 23 homologues de Bcl-2 chez les mammifères (Tableau IV). Des homologues ont également été trouvés chez les virus: BHRF1 dans le virus Epstein-Barr, E1B 19K dans l'adénovirus. Les membres de cette famille ont des régions conservées, les domaines BH (*"**B**cl-2 **h**omology region")* qui sont nécessaires à la régulation de l'apoptose et aux interactions protéine-protéine. Le domaine BH3 est commun à tous les membres humains de la famille Bcl-2 (Tableau IV) et nécessaire à l'induction de l'apoptose par les protéines pro-apoptotiques (Chittenden *et coll.*, 1995; Inohara *et coll.*, 1997b, Zha *et coll.*, 1997; O'Connor *et coll.*, 1998) sauf Mtd et DIVA/Boo (Inohara *et coll.*, 1998b). Plusieurs protéines de la famille Bcl-2 peuvent interagir physiquement entre elles par leurs domaines d'homologie et former des homo- et hétéro-dimères. Elles peuvent aussi s'associer à d'autres protéines par leur domaine BH4 (Lithgow T. *et coll.*, 1994).

Bcl-2 bloque le relargage du cytochrome c de la mitochondrie , supprimant ainsi l'activation de la procaspase-9 dépendant d'Apaf-1 (Pan G. *et coll.*, 1998). Un autre modèle d'action a été proposé, basé sur des observations faites chez *C. elegans*. La protéine anti-apoptotique CED-9 présente des homologies avec la protéine Bcl-2. Elle bloque la mort cellulaire en se complexant avec CED-4, l'homologue d'Apaf-1, réduisant son aptitude à activer CED-3. La protéine EGL-1, qui ne comporte qu'un domaine d'homologie BH3, empêche l'interaction entre CED-9 et CED-4 et promeut l'activation de CED-3 (del Peso *et coll.*, 1998). Des interactions semblables, impliquant Apaf-1, la caspase-9 et Bcl-X_L, un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2, pourraient se produire dans les cellules de mammifères. Boo /

DIVA interagit également avec Apaf-1, formant un complexe multimérique avec Apaf-1 et la procaspase-9 et inhibant l'activation de cette caspases (Song *et coll.*, 1999). Dans ce modèle, les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, tels que Bak et Bik empêchent la liaison des protéines anti-apoptotiques à l'apoptosome. Ce modèle de l'apoptosome contenant Bcl-2 ou Bcl-X_L reste très controversé (Hausmann *et coll.*, 2000).

Les protéines de la famille Bcl-2 régulent l'homéostasie mitochondriale. Les protéines qui ne possèdent en commun qu'un domaine BH3 semblent promouvoir le relargage du cytochrome c (Luo X. *et coll.*, 1998; Li H. *et coll.*, 1998; Shimizu *et coll.*, 2000a), alors que celles contenant un domaine BH4 inhibent habituellement le relargage du cytochrome c (Shimizu *et coll.*, 2000b). Les protéines Bcl-X_L et Bcl-2 peuvent être clivées par les caspases-3 et -1 au cours de l'apoptose (Clem *et coll.*, 1998; Fujita *et coll.*, 1998; Cheng *et coll.*, 1997). Ce clivage transforme les protéines anti-apoptotiques Bcl-X_L et Bcl-2 en protéines tronquées pro-apoptotiques grâce à la délétion du domaine BH4. Pour ce qui est de Bcl-X_L, cela empêcherait sa fixation à CED-4 d'où l'activation de la procaspase-9 (Tsujimoto & Shimizu, 2000, pour revue).

Pour résumer, on peut considérer qu'il y a six mécanismes d'action des membres de la famille Bcl-2:
1: interaction avec Apaf-1 pour inhiber l'apoptosome
2: interaction avec VDAC / ANT pour moduler le relargage du cytochrome c
3: formation de canaux dans les membranes mitochondriale, nucléaire et du réticulum endoplasmique
4: modulation des flux calciques au niveau du réticulum endoplasmique
5: effet sur le glutathion
6: transmission des signaux de mort jusqu'à la mitochondrie

Les protéines de choc thermique Hsp : Les Hsps appartiennent à une famille très conservée divisée en plusieurs sous-familles en fonction du poids moléculaire des protéines. Certaines sont exprimées constitutivement comme Hsp90 et Hsp60 alors que d'autres sont induites en réponse à un

Membre de la famille Bcl-2	Fonction apoptotique		Domaines				
	ANTI	PRO	BH1	BH2	BH3	BH4	TM
Sous-famille Bcl-2							
Bcl-2	+		+	+	+	+	+
Bcl-XL	+		+	+	+	+	+
Bcl-w	+		+	+	+	+	+
Mcl-1	+		+	+	+	+/-	+
DIVA/Boo	+		+	+	+	+	+
NR-13**	+		+	+	+		+
A1/BFL-1	+		+	+	+	+/-	+
E1B-19K*	+		+				
LMW5-HL*	+		+	+			
BHRF-1*	+		+	+			+
ORF16*	+		+	+			+
KS-Bcl-2*	+		+	+			+
Bcl-XS		+			+	+	+
Sous-famille Bax							
Bax		+	+	+	+		+
Bak		+	+	+	+		+
Bok/Mtd		+	+	+	+		+
Sous-famille BH3							
Bik/Nbk/Blk		+			+		+
Hrk/Dp5		+			+		+
BNIP3		+			+		+
BNIP1		+			+		+
Bim/Bod		+			+		+
Bad		+			+		
Bid		+			+		
Nix		+			+		+

Tableau IV : Les protéines de la famille Bcl-2. Ces protéines peuvent classées en 3 sous-familles. Tous les membres de cette famille ont été clonés chez les mammifères à l'exception de ceux avec une étoile (*) qui sont d'origine virale et de NR-13 qui a été cloné chez le poulet (**). Les membres de cette famille possèdent différents domaines BH pour "*Bcl-2 homology region* " qui sont nécessaires pour la régulation de l'apoptose et des interactions protéine-protéine.

stress cellulaire. Les Hsp constitutives sont des protéines chaperonnes intervenant, entre autre, dans la translocation intracellulaire des protéines et le maintien des structures cellulaires. Comme les membres de la famille Bcl-2, ces protéines peuvent avoir des fonctions anti- et pro-apoptotiques.

- La surexpression d'Hsp90 augmente l'apoptose des cellules leucémiques humaines U937 traitées par le TNF-α alors qu'Hsp60 et Hsp10 accélèrent

l'activation de la caspase-3 dans les cellules Jurkat (Galea-Lauri *et coll.*, 1996; Samali *et coll.*, 1999; Xanthoudakis *et coll*, 1999).

- La surexpression d'Hsp70 protège les cellules de l'apoptose. Divers mécanismes ont été proposés pour expliquer cet effet, notamment la "réparation" des protéines clivées par les caspases effectrices (Jaattela *et coll.*, 1998) et l'interaction avec Apaf-1 prévenant la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases effectrices (Beere *et coll.*, 2000; Saleh *et coll.*, 2000).
- Au sein de notre laboratoire, il a été montré qu'Hsp27 inhibait l'activation de la procaspase-9 en se liant avec le cytochrome c après son relargage de la mitochondrie (Garrido *et coll.*, 1999; Bruey *et coll.*, 2000).

1.3.6 - Relations caspases / apoptose :

1.3.6.1 - L'apoptose dépendant des caspases :

De nombreux stimuli apoptotiques induisent l'activation de caspases dans la cellule. La nature de ces caspases varie en fonction du stimulus et de la cellule cible. La surexpression d'une caspase induit l'apoptose de ces cellules, un effet prévenu par la mutation de la cystéine catalytique (Boldin *et coll.*, 1996; Duan *et coll.*, 1996). En l'absence de stimulus apoptotique, les caspases ne sont habituellement pas activées. La non activation des caspases suggère plusieurs hypothèses : elles peuvent être liées à un inhibiteur qui prévient leur activation, localisées dans un compartiment subcellulaire dans lequel elles ne sont pas accessibles, ou incapables d'interagir avec les molécules adaptatrices du fait de la conformation de ces adaptateurs (Kumar, 1995a, pour revue). Chez la drosophile, l'effet pro-apoptotique de RPR, HID et GRIM est inhibé par interaction avec des IAPs (Vucic *et coll.*, 1998). Des peptides synthétiques mimant le site de reconnaissance des caspases au niveau de leur cible ont un effet d'inhibition compétitive de ces enzymes. Ces peptides sont utilisés expérimentalement pour bloquer l'activité des caspases, avec une spécificité qui dépend notamment de la longueur de leur séquence et des concentrations utilisées (Enari *et coll.*, 1996; Dubrez *et coll.*, 1996).

1.3.6.2 L'apoptose indépendante des caspases :

Une apoptose indépendante des caspases a été identifiée ces dernières années. Par exemple, l'oxyde nitrique (NO) induit l'apoptose des cellules HeLa sans activer les caspases (Okuno *et coll.*, 1998). Cette apoptose est insensible aux inhibiteurs de caspases tels que Z.VAD.fmk ou p35, l'inhibiteur du baculovirus, alors qu'elle est prévenue par la surexpression de Bcl-2. Des cellules traitées par des agents endommageant l'ADN ou dans lesquelles l'oncogène Ras est surexprimé en présence de Z.VAD.fmk ou BD.fmk forment néanmoins des corps apoptotiques et meurent, même si l'on ne peut détecter d'activation des caspases, de condensation de la chromatine ou de fragmentation internucléosomale de l'ADN (McCarthy *et coll.*, 1997). Lorsque l'on surexprime Bax dans des cellules, Z.VAD.fmk inhibe l'activation de la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN mais n'inhibe pas la mort cellulaire (Xiang *et coll.*, 1996; Miller *et coll.*, 1997). Une apoptose indépendante des caspases a pu être induite par de nombreux autres stimuli, incluant l'acidification intracellulaire (Zanke *et coll.*, 1998), le ganglioside GD3 (De Maria *et coll.*, 1997), la puromycine (Schlapbach & Fontana, 1997), l'irradiation, l'étoposide, la dexaméthasone ou encore l'actinomycine D (Amarantes-Mendes *et coll.*, 1998; Brunet *et coll.*, 1998; Ekert *et coll.*, 1999a, pour revue). Dans tous les cas, l'inhibiteur des caspases Z.VAD.fmk bloque l'activation des caspases et la fragmentation nucléaire mais les noyaux ont une forme irrégulière, la chromatine est partiellement condensée, les cellules bourgeonnent et finissent par former des corps apoptotiques et aucun sauvetage n'est possible, ce que confirment des test de clonogénicité.

Est ce définitivement la preuve d'une apoptose indépendante des caspases ? On peut apporter 3 réserves :

1 - On ne peut exclure que des caspases non identifiées soient insensibles aux inhibiteurs et activées dans cette forme de mort cellulaire.

2 - La stabilité de l'inhibiteur à l'intérieur de la cellule est une donnée essentielle : le peptide inhibiteur Z.DEVD.fmk est peu puissant parce que rapidement dégradé. Des substitutions appropriées peuvent stabiliser

l'inhibiteur tout en concervant son effet (Ekert *et coll.*, 1999b).
3 - Z.VAD.fmk peut inhiber d'autres activités enzymatiques, comme la calpaïne ou la cathepsine B, induisant par là même une toxicité cellulaire.

1.3.6.3 - Activation des caspases sans apoptose :

Les caspases sont impliquées dans des fonctions physiologiques autres que l'apoptose. La caspase-1 est responsable de la maturation de l'IL-1ß et de l'IL-18, deux cytokines ayant un rôle important dans l'inflammation (Thornberry *et coll.*, 1992; Ghayur *et coll.*, 1997), ce qui a été confirmé par les expériences de délétion génique chez la souris (Li *et coll.*, 1995). Il semble que, chez la souris, l'activation de la caspase-1 nécessite la caspase-11 (Figure 15). Les souris déficiente en caspase-11 sont incapables de produire les isoformes matures de l'IL-1 après stimulation par les LPS, suggérant que la caspase-11 agirait en amont de la caspase-1 (Wang *et coll.*, 1998). D'une manière générale, les caspase-1, -4, -5 et -11 semblent plus impliquées dans la maturation des cytokines lors de la réaction inflammatoire que dans l'apoptose.

La caspase-3 est activée dans des lymphocytes T stimulés par le PHA (***Phytohémaglutinine A***) sans qu'il y ait pour autant apoptose (Miossec *et coll.*, 1997). La caspase-3 serait impliquée dans la maturation de l'interleukine-16 (Zhang *et coll.*, 1998). La caspase-8 est activée dans les lymphocytes T activés (Kennedy *et coll.*, 1999) et plusieurs caspases sont activées lors de la maturation des érythroblastes dans la moelle osseuse hématopoiétique (De Maria *et coll.*, 1999 + Zermatti *et coll.*, soumis à publication) ou la différenciation des cellules leucémiques (Sordet *et coll.*, soumis à publication).

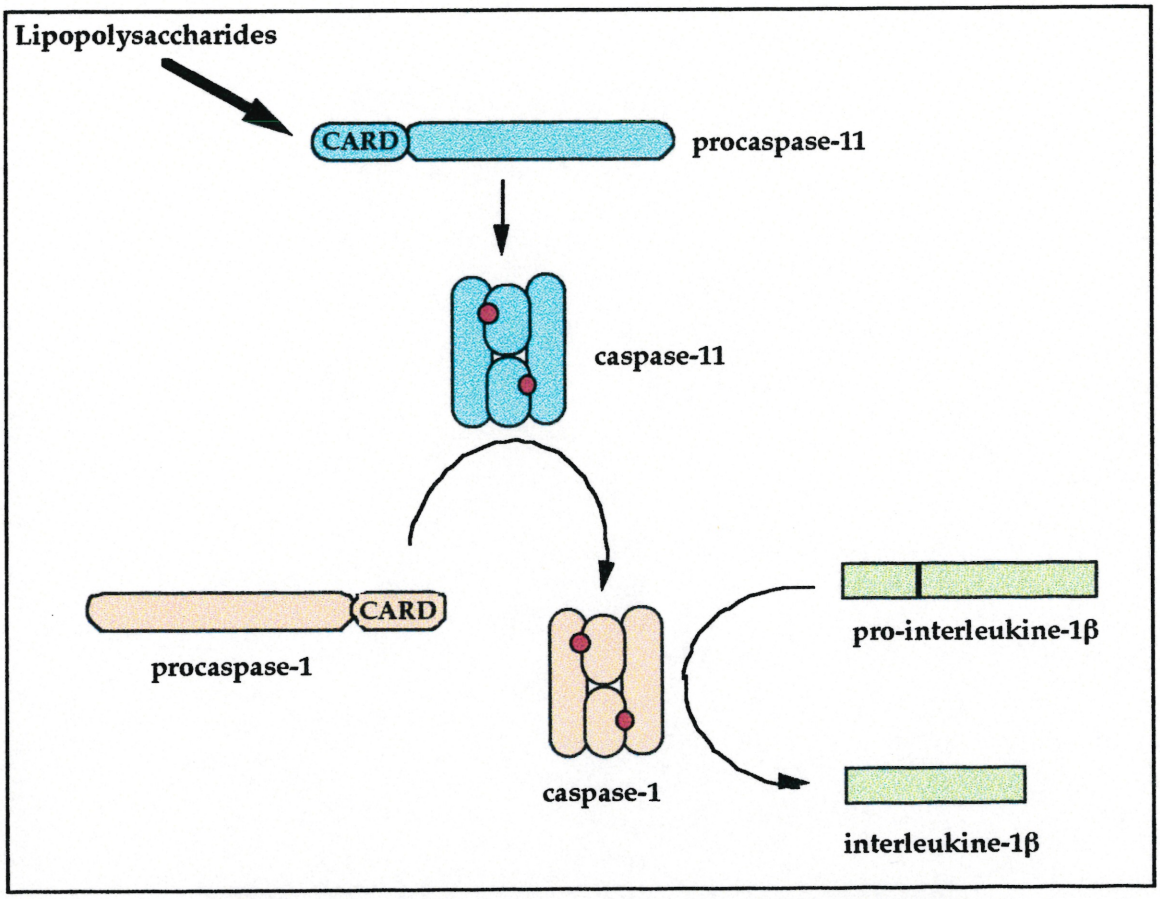


Figure 15: Maturation de la pro-interleukine-1β

1.4 - La caspase-2 :

L'identification de la caspase-2 : En 1992, Kumar *et coll.* isolent une dizaine de gènes dont l'expression décroît au cours du développement embryonnaire du système nerveux central chez la souris. Un de ces gènes, *Nedd-2* (*"Neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated gene"*), a une forte homologie de séquence avec le gène *ced-3* chez le nématode et le gène *Ice/CASP-1* chez les mammifères (Kumar *et coll.*, 1994a). Pendant le développement embryonnaire de la souris, *Nedd-2* est fortement exprimé dans différents tissus, en particulier le système nerveux central, le foie, les poumons et la rate. Cette expression de *Nedd-2* est corrélée au déclenchement de la mort cellulaire dans ces tissus. Chez l'adulte, *Nedd-2* est exprimé dans le cerveau, la rate, les poumons, les testicules, les reins, le muscle squelettique, le foie, le thymus, les ovaires et l'intestin. *Nedd-2* code pour une protéine d'environ 51 kDa, essentiellement hydrophobe, sans domaine transmembranaire. L'homologue humain de

Nedd-2, *Ich-1* a été isolé par Wang *et coll.*. (1994) à partir d'une banque d'ADN complémentaire de cerveau foetal. Cette protéine NEDD2/ICH1, contenant un site QACRG, est la deuxième procaspase à avoir été identifiée. Il s'agit donc, dans la nomenclature actuelle, de la procaspase-2.

Le gène *CASP-2* : Le gène *CASP-2* est localisé sur le chromosome 7 en q34-35 chez l'homme et sur le chromosome 6 murin dans une région analogue de celle identifiée chez l'homme (Kumar *et coll.*, 1995b). *CASP-2* est situé à proximité du gène *TRCB* localisé en 7q35, une région fréquemment affectée dans les hémopathies malignes, en particulier les leucémies aigües myéloblastiques (LAM) dans lesquelles des délétions non aléatoires de la région 7q22-36 et des translocations impliquant la région 7q34-35 sont communément observées.

Le gène *Nedd-2* contient 10 exons localisés sur une région d'ADN génomique d'environ 15 kpb (Kumar *et coll.*, 1997). Que ce soit chez la souris ou chez l'homme, l'épissage alternatif de l'ARNm génère deux isoformes : *CASP-2L* et *CASP-2S*. *CASP-2L* contient 9 exons (moins l'exon VII) et code pour une protéine d'environ 50 kDa (procaspase-2L) alors que *CASP-2S* contient les 10 exons et code pour une protéine d'environ 35 kDa (procaspase-2S) (Figure 16). La différence entre *CASP-2L* et *CASP-2S* vient de l'exon VII contenant 61 pb. Cette insertion de 61 pb dans *CASP-2S* change le cadre de lecture et introduit un codon stop si bien que la procaspase-2S n'a pas de petite sous-unité (Figure 16).

Wang *et coll.* (1994) décrivent une différence entre *CASP-2L* et *CASP-2S* au niveau du codon d'initiation de la traduction. La première méthionine de la procaspase-2S se trouve 14 acides aminés en amont de celle de la procaspase-2L. Kumar *et coll.* (1997) ne trouvent pas cette différence. Quoiqu'il en soit, l'isoforme longue est 2 à 15 fois plus exprimée que l'isoforme courte dans différents tissus à l'exception du cerveau et du muscle squelettique où les deux isoformes sont exprimées en quantité égale.

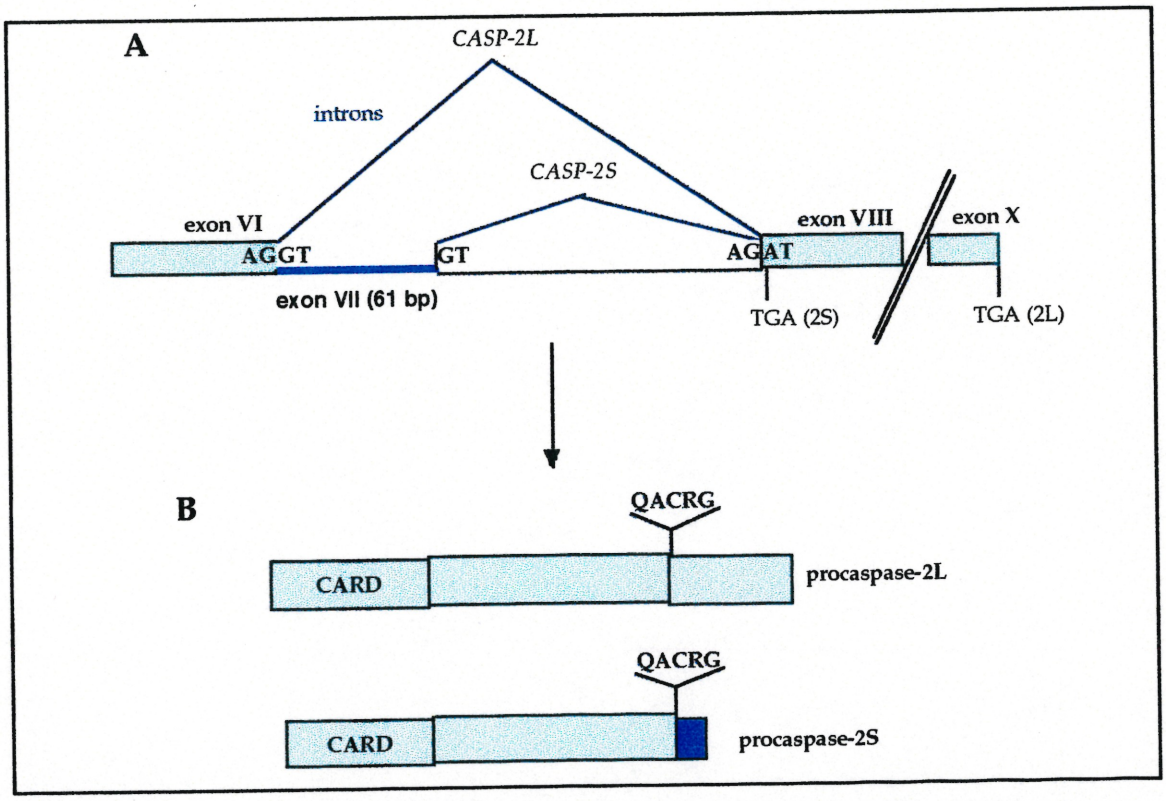


Figure 16: (**A**) Structure du gène *CASP-2*. (**B**) Epissage alternatif conduisant à la formation des procaspases-2 L et -2S. La procaspase-2S n' a pas de petite sous-unité. Selon Wang L. *et coll.* (1994), le codon d'initiation de la procaspase-2S serait 14 acides aminés en aval de celui de la procaspase-2L tandis que Kumar S. *et coll.* (1997) trouvent le même codon d'initiation pour les deux isoformes.

La caspase-2 est à la fois anti- et pro-apoptotique : La surexpression de l'isoforme longue humaine induit l'apoptose dans les cellules transfectées tandis que l'expression d'un antisens dirigé contre *CASP-2L* dans les cellules FDC-P1 retarde l'apoptose induite par privation de facteurs de croissance (Wang *et coll.*, 1994; Kumar, 1994b; Kumar, 1995c). La surexpression de l'isoforme courte humaine protège de l'apoptose induite par privation de sérum (Wang *et coll.*, 1994). La surexpression de l'isoforme courte murine n'induit pas d'apoptose mais ne protège pas de l'apoptose induite par la forme longue (Kumar *et coll.*, 1997). En fait, la délétion du gène codant pour la procaspase-2 a des effets à la fois positifs et négatifs sur l'apoptose que dans certains tissus. Dans les cellules germinales femelles, l'absence de caspase-2 provoque une accumulation d'ovocytes dans les ovaires et les rend résistants à l'apoptose induite par la doxorubicine (Bergeron *et coll.*, 1998). Ce manque d'apoptose est tissu spécifique puisque les blastocystes caspase-2-/- sont toujours sensibles au traitement par la doxorubicine. L'absence de

caspse-2 provoque un déficit en neurones moteurs faciaux sans effet sur le nombre de neurones dans d'autres territoires (Bergeron *et coll.*, 1998). Ces résultats suggèrent que le taux d'apoptose dans un tissu donné au cours du développement dépend du rapport entre les deux isoformes de la procaspase-2.

Le prodomaine de la procaspase-2 possède un domaine CARD : Le prodomaine de la procaspase-2 possède un domaine CARD. Ce domaine CARD permet son interaction avec celui de CRADD/RAIDD, une molécule adaptatrice de la voie TNF (Ahmad *et coll.*, 1997; Duan & Dixit, 1997). CRADD/RAIDD contient aussi dans sa partie carboxy-terminale un domaine de mort qui permet son interaction avec le domaine de mort de RIP, une sérine/thréonine kinase recrutée par le récepteur 1 du TNF et qui est nécessaire à l'activation de NFκB (Kelliher *et coll.*, 1998) (Figure 17).

La surface du CARD de RAIDD contient une région basique formée par les hélices 1, 3 et 4 et une région acide formée par les hélices 2, 5 et 6. La modélisation du CARD de la procaspase-2 montre une structure similaire et une polarité de surface suggérant que l'intéraction entre RAIDD et la procaspase-2 se fait grâce à des ponts électrostatiques entre les deux domaines CARD (Chou *et coll.*, 1998) (Figure 19). Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que les acides aminés E83 et E87 du domaine CARD de la procaspase-2L étaient nécessaire à son interaction avec RAIDD (Duan & Dixit, 1997) (Figure 18).

Le rôle de l'interaction procaspase-2/RAIDD dans l'activation de cette caspase reste à démontrer. Il existe des différences importantes entre l'intéraction RAIDD/procaspase-2 et l'interaction Apaf-1/procaspase-9. Le domaine CARD de RAIDD contient six hélices alpha alors que ceux de la procaspase-9 et d'Apaf-1 en contiennent sept (Qin *et coll.*, 1999). Deux de ces hélices H2 et H3 dans Apaf-1 forment une surface convexe acide qui est directement impliquée dans la reconnaissance et l'interaction avec la surface concave basique du CARD de la procaspase-9 formée par les hélices H1a, H1b et H4. Tous les domaines CARD n'ont donc pas les mêmes propriétés. Une

interaction entre la procaspase-2L et CARD4 a été observée mais le rôle de cette interaction est encore inconnu (Bertin *et coll.*, 1999).

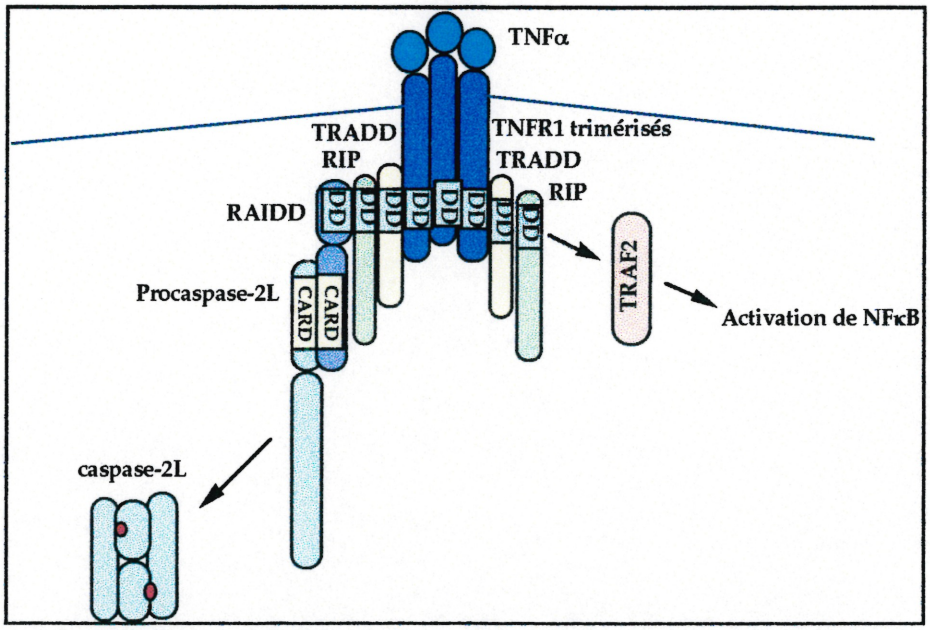


***Figure 17*: Activation par recrutement de la procaspase-2L.**

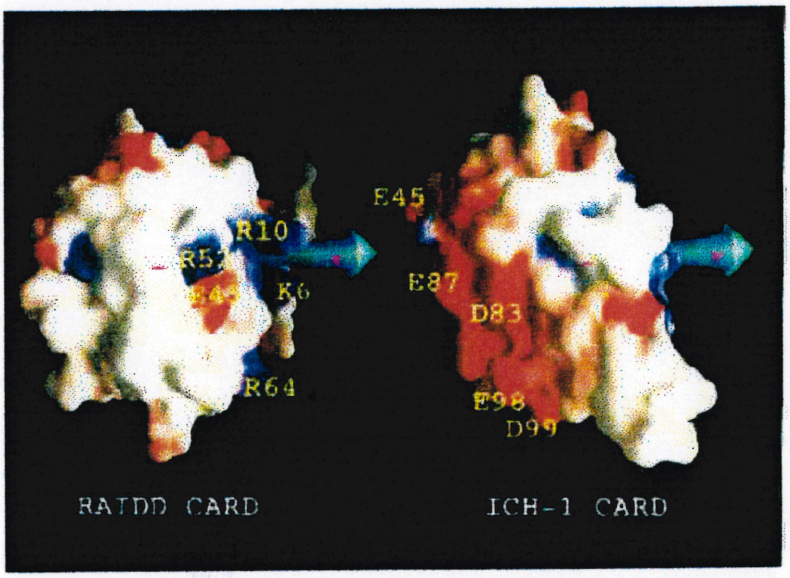


Figure 18: Schéma des surfaces supposées d'intéraction entre les domaines CARD de RAIDD et de la procaspase-2L. Les acides aminés essentiels pour cette intéraction sont mentionnés. Des expériences de mutagenèse dirigée ont démontré que les acides aminés E83 et E87 du domaine CARD de la procaspase-2L sont essentiels pour l 'intéraction avec RAIDD. Les moments dipolaires électriques des deux domaines sont représentés par une flèche bleue. Les potentiels électriques < -8 k_B T sont représentés en rouge tandis que ceux >+ 8 k_B T sont représentés en bleu où k_B et T représentent la constante de Boltzmann et la température, respectivement. (d 'après Chou *et coll.*, 1998)

Les *"Death Effector Filaments"* : Lorsque l'on surexprime la procaspase-2L dans des cellules de mammifères, on induit leur apoptose (Kumar *et coll.*, 1994b). Après transfection, la procaspase-2L et son prodomaine forment des filaments élaborés qui peuvent être visualisés en utilisant des protéines fusionnées à la GFP (*"Green Fluorescent Protein"*) (Colussi *et coll.*, 1998a). La formation de ces filaments dépend du domaine CARD. Le rôle de ces nouvelles structures n'est pas encore bien compris. On observe que :

1 - La surexpression des domaines CARDs de RAIDD et de la procaspase-2 induit la formation de filaments sans provoquer d'apoptose (Shearwin-Whyatt *et coll.*, 2000).

2 - Tous les domaines CARD n'ont pas l'aptitude à s'oligomériser puisque le domaine CARD de la caspase-9 en est incapable (Colussi *et coll.*, 1998a).

3 - La surexpression des DEDs de FADD ou de la procaspase-8 induit la formation de filaments intracellulaires appelés DEFs (*"Death Effector Filaments"*) probablement par oligomérisation (Siegel *et coll.*, 1998). Ces DEFs induisent l'apoptose en recrutant et en activant les caspases (Siegel *et coll.*, 1998).

4 - La génération de DEFs contenant FADD et la caspase-8 a aussi été observée dans des cellules Jurkat et CEM traitées par le cycloheximide (Tang *et coll.*, 1999).

Les filaments RAIDD-CARD et les filaments FADD-DED ont donc une apparence semblable mais des propriétés opposées.

Autoactivation : Le prodomaine de la procaspase-2L est nécessaire à son homodimérisation. Cette homodimérisation permet son activation. Le prodomaine est nécessaire à l'activation de cette caspase (Colussi *et coll.*, 1998a). Sa fonction première semble être de permettre la dimérisation des formes précurseurs. Cette dimérisation est nécessaire et suffisante pour l'activation de l'enzyme. En effet, une procaspase-3 chimérique contenant le prodomaine de la procaspase-2L s'active spontanément après dimérisation impliquant les motifs CARD du prodomaine (Colussi *et coll.*, 1998b).

Caspase initiatrice ou caspase effectrice ? La procaspase-2L est recrutée très tôt au niveau de TNF-R1 grâce à la molécule adaptatrice RAIDD, suggérant que la procaspase-2L est une procaspase initiatrice. Cependant, les souris *CASP-2* -/- ne sont pas résistantes à l'apoptose induite par le TNF. La procaspase-2 est rapidement activée dans les cellules megacaryoblastiques humaines Mo7e et dans la lignée cellulaire du lymphome de Burkitt BL30A en réponse à différents stimuli, avant l'activation de la procaspase-3 (Harvey *et coll.*, 1997). Au contraire, l'activation de la caspase-3 précède le clivage de la procaspase-2L dans les cellules HeLa et l'activation des deux enzymes est alors prévenue par Bcl-2 (Swanton *et coll.*, 1999). Dans un système acellulaire établi à partir des cellules Jurkat (Slee *et coll.*, 1999), la procaspase-2L est activée par la caspase-3. Ainsi, selon le type cellulaire et le stimulus, la procaspase-2L pourrait être effectrice ou initiatrice, comme cela a été constaté pour les procaspases-8 et -10.

Activation de la procaspase-2L : L'activation de la procaspase-2L nécessite plusieurs clivages. Le premier, du côté carboxy-terminal de la protéine, libère 2 fragments de 34 et 14 kDa. Il pourrait être induit par la caspase-3. Le second sépare le prodomaine de la grande sous-unité (18 kDa) qu'il libère. Le troisième sépare la petite sous-unité (12 kDa) d'un fragment intermédiaire. Le second et le troisième clivages impliquent une protéase distincte de la caspase-3 mais non identifiée (Li *et coll.*, 1997) (Figure 19). Dans une étude *in vitro*, les caspases-3 et -8 sont les plus efficaces que les caspases-1, -2, -6, -7 et -11 (Van de Craen M. *et coll.*, 1999). La procaspase-2L est incapable d'activer les procaspases connues si ce n'est elle-même.

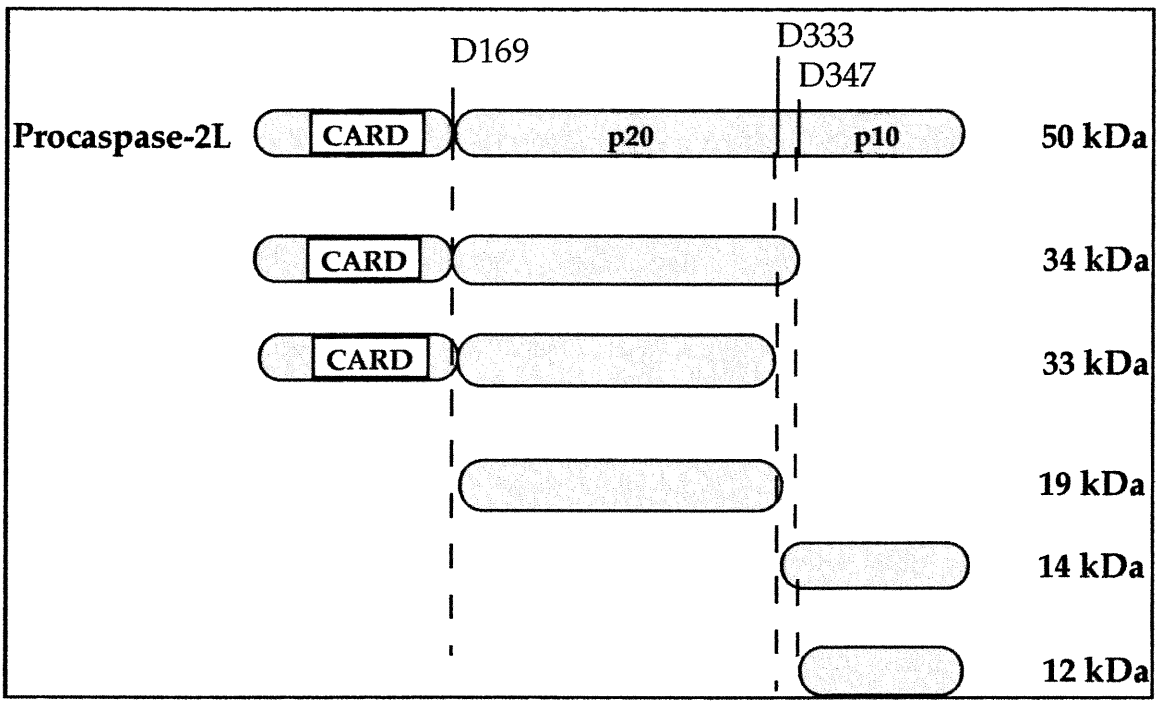


Figure 19: Différents fragments de clivage observés conduisant à l'activation de la procaspase-2L.

Localisation subcellulaire : Colussi *et coll.* (1998a) ont montré que la procaspase-2L pouvait être localisée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules COS et NIH-3T3 et qu'elle pouvait être activée dans ces deux compartiments. Cette localisation nucléaire de la procaspase-2L se fait par l'intermédiaire de son prodomaine. En effet, la procaspase-3 qui est habituellement localisée dans le cytoplasme et dans l'espace intermitochondrial, se trouve transloquée dans le noyau si elle est fusionnée au prodomaine de la procaspase-2L (Colussi *et coll.*, 1998a). Plus récemment, Shearwin-Whyatt *et coll.* (2000) ont montré que la surexpression de la procaspase-2L induisait une relocalisation de RAIDD dans le noyau. Lorsqu'on co-exprime une caspase-2L sans prodomaine et RAIDD, aucune translocation n'a lieu, suggérant que RAIDD est transloqué dans le noyau grâce au prodomaine de la procaspase-2. Enfin, Susin S.A. *et coll.* (1999) ont observé que la procaspase-2L était également localisée avec la procaspase-9 dans l'espace intermitochondrial. Après induction de l'apoptose, ces procaspases sont relarguées des mitochondries et activées. Cette redistribution est inhibée par Bcl-2. Ainsi, la procaspase-2L est localisée à la fois dans le cytoplasme, dans le noyau et dans les mitochondries. Cette

répartition subcellulaire se modifie lors de la différenciation (Sordet et *coll.*, manuscrit en préparation).

Substrat de la caspase-2 : Mancini *et coll.* (2000) ont observé que la caspase-2L était associée à la membrane de l'appareil de Golgi, sur son versant cytoplasmique. Un substrat de la caspase-2L a été identifié dans l'appareil de Golgi. Il s'agit de la Golgine 160 qui est clivée par les caspases-2L, -3 et -7 *in vitro*. La caspase-2L clive la Golgine 160 au niveau du site ESPD^{59}G libérant un fragment de 163 kDa tandis que la caspase-3 clive la protéine au niveau du site CSTD^{139}S libérant un fragment de 155 kDa. On peut d'ailleurs observer que la Golgine 160 est le premier substrat de la caspase-3 ayant une cystéine en position P4. Enfin, le site SEVD^{311}G est clivée par les caspases-2L, -3 et -7. Dans les cellules HeLa traitées par la staurosporine, le premier fragment observé est celui de 163 kDa qui au cours de la cinétique disparait au profit du fragment de 140 kDa. Si on prévient le clivage de la Golgine 160 par la caspase-2L au niveau de son site unique en mutant l'aspartate en position 59, on retarde la désintégration de l'appareil de Golgi au cours de l'apoptose (Mancini *et coll.*, 2000). Cette observation suggère plusieurs questions : Comment la procaspase-2L se fixe-t-elle au niveau de la membrane golgienne ? quelle est la fonction de la Golgine 160 ? quelles sont les conséquences de ce clivage ?

1.5 - Objectifs du projet

La surexpression de chacune des caspases peut induire la mort cellulaire par apoptose. Cependant, le rôle respectif de chacune de ces protéases dans les différentes voies d'induction de l'apoptose au sein d'une même cellule est encore mal connu. Notre équipe avait montré que la caspase-3 jouait un rôle central dans une cascade protéolytique conduisant à l'apoptose des cellules leucémiques humaines U937 traitées par l'étoposide (Dubrez *et coll.*, 1996). Cette observation nous a conduit à nous interroger sur le rôle des autres caspases dans ce modèle. Pour répondre à cette question, nous avons pensé qu'il serait utile de déterminer si l'expression des caspases était homogène ou hétérogène dans les lignées leucémiques humaines et les cellules leucémiques de patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique. Ceci nous a conduit à étudier, par RT-PCR, l'expression d'un certain nombre de gène *CASP* dans ces cellules. Nous avons alors constaté que le traitement par un agent cytotoxique modulait l'expression de certains de ces gènes *CASP*, en particulier du gène *CASP-2S*. En outre, la RT-PCR nous a permis d'identifier de nouvelles isoformes du gène *CASP-2*. Dans la suite de nos travaux, nous nous sommes donc attachés à préciser le rôle des différentes isoformes de la caspase-2 dans notre modèle cellulaire.

2.1 - Upregulation of CASP genes in human tumor cells undergoing etoposide-induced apoptosis (Oncogene 16, 2885-2894, 1998)

Afin de déterminer si l'expression des gènes codant pour différentes caspases était homogène ou hétérogène dans les cellules leucémiques humaines (lignées leucémiques et cellules leucémiques de patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique), nous avons utilisé la technique de réaction en chaîne utilisant la polymérase après transcription inverse des ARNm ou RT-PCR. Nous avons étudié l'expression de ARNm de gènes *CASP-2L*, *CASP-2S*, *CASP-3*, *CASP-4* et *CASP-6* dans différentes lignées leucémiques humaines.

Nous avons constaté que l'expression des gènes *CASP* était très hétérogène d'une lignée à une autre, d'un patient à un autre. Par exemple, l'ARNm *CASP-4* n'est pas détecté dans la lignée K562. L'étude de l'expression de la protéine correspondante en western blot a montré qu'il n'y avait pas de corrélation significative entre l'expression de ces gènes et l'expression des protéines correspondantes.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence d'un agent cytotoxique, l'étoposide, sur l'expression des gènes *CASP*. Dans la lignée leucémique humaine U937, nous avons constaté qu'un traitement continu par 50 µM d'étoposide induisait une augmentation de l'expression de certains ARNm de gènes *CASP (CASP-2S* et *CASP-3)*. Dans ce cas, l'accumulation de l'ARNm s'accompagne d'une accumulation de la protéine correspondante. Ces résultats ont été confirmés dans la lignée de cancer colique humain HT29 permettant de mieux séparer les cellules pré-apoptotiques encore adhérentes des cellules apoptotiques détachées du flacon de culture.

L'induction des ARNm des gènes *CASP* observée dans les cellules U937 et HT29 en réponse à l'étoposide pouvait s'expliquer par une

augmentation de la transcription du gène et/ou une augmentation de la stabilité de l'ARNm. En réalisant des expériences de transcription *in vitro* sur noyaux isolés (nuclear run on), nous avons montré que cette induction était d'origine transcriptionnelle. Cependant, une stabilisation du messager ne peut être définitivement exclue.

De manière assez surprenante et pour l'instant inexpliquée, la surexpression de l'oncogène *bcl-2* dans la lignée U937, qui retarde l'apparition de la fragmentation internucléosomale de l'ADN et l'activation des caspases-3 et -2L, prévient l'augmentation transcriptionnelle des messagers des gènes *CASP* tout en prolongeant leur expression. Cette prolongation de l'expression des messagers *CASP* est également observée lorsqu'on traite les cellules U937 avec les inhibiteurs spécifiques des caspases zVAD et DEVD en présence de l'étoposide.

Nos résultats suggèrent que l'accumulation des messagers des gènes *CASP-2* et *CASP-3* dans les cellules tumorales en réponse aux agents cytotoxiques pourrait être prédictive de leur sensibilité à ces agents.

Oncogene (1998) 16, 2885–2894
© 1998 Stockton Press All rights reserved 0950–9232/98 $12.00
http://www.stockton-press.co.uk/onc

Upregulation of *CASP* genes in human tumor cells undergoing etoposide-induced apoptosis

N Droin[1], L Dubrez[1], B Eymin[1], C Renvoizé[2], J Bréard[2], MT Dimanche-Boitrel[1] and E Solary[1]

[1]*CJF INSERM 94-08, Biology and Therapy of Cancer Group, UFR of Medicine, 7, boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon and* [2]*INSERM U461, U.F.R. of Pharmacy, Chatenay-Malabry, France*

Caspases are aspartate-specific cysteine proteases that play a pivotal role in drug-induced cell death. We designed RT–PCR assays to analyse the expression of *CASP-3*, *CASP-4*, *CASP-6* and the long and short isoforms of *CASP-2* genes in human cells. These genes heterogeneously coexpress in leukemic cell lines and bone marrow samples from patients with *de novo* acute myelogenous leukemia at diagnosis. Treatment of U937 and HL60 leukemic cells and HT29 colon carcinoma cells with the topoisomerase II inhibitor etoposide upregulates *CASP-2* and *CASP-3* genes in these cells before inducing their apoptosis. This effect of etoposide is not observed in K562 cells and *bcl-2*-transfected U937 cells which are less sensitive to drug-induced apoptosis. Nuclear run-on experiments demonstrate that etoposide increases *CASP* gene transcription in U937 cells, an effect that is prevented by Bcl-2 overexpression. Upregulation of *CASP* genes is associated with an enhanced synthesis of related procaspases that precedes the appearance of apoptosis markers including caspase-3 activation, poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and internucleosomal DNA fragmentation. These results suggest that the ability of tumor cells to upregulate *CASP-2* and *CASP-3* genes in response to cytotoxic drugs could be predictive of their sensitivity to drug-induced apoptosis.

Keywords: apoptosis; caspases; etoposide; human tumor cells

Introduction

Genetic analyses performed in *Caenorrhabditis elegans* identified the genes that are necessary for apoptosis during embryonic development of this nematode: *ced-9* and a long isoform of *ced-4* encode negative regulators that suppress inappropriate cellular suicide while *ced-3* and a short isoform of *ced-4* encode effector components of the cell death pathway (Hentgartner and Horvitz, 1994a; Shaham and Horvitz, 1996). The mammalian homolog of *ced-9* is *bcl-2* which can substitute functionally for *ced-9* (Hentgartner and Horvitz, 1994b). The CED-3 protein demonstrates significant homologies with the interleukin-1β converting enzyme (ICE) family of cysteine proteases, now referred as caspases (Yuan *et al.*, 1993; Alnemri *et al.*, 1996). These aspartate-specific proteases exist in the cytosol as proenzymes that are proteolytically activated at internal aspartate residues to form a heterodimeric catalytic domain (Takahashi and Earnshaw, 1996). Cell death induced by mammalian CED-3-like caspases can be inhibited by overexpression of Bcl-2 (Chinnaiyan *et al.*, 1996; Meisenholder *et al.*, 1996; Armstrong *et al.*, 1996; Monney *et al.*, 1996) and the Bcl-2-related protein Bcl-X_L (Erhardt and Cooper, 1996). While no homolog of *ced-4* has been so far identified in mammals, a CED-4-like protein could mediate protection by Bcl-2 against cell death induced by CED-3-related proteases (Chinnaiyan *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997).

At least ten caspases have been identified in humans, most of them inducing apoptosis when overexpressed (Miura *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 1994). At least *in vitro*, some of them are capable of activating others in a manner analogous to the protease zymogens of the coagulation or complement cascades (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Greidinger *et al.*, 1996; Orth *et al.*, 1996). Despite the rapidly growing knowledge of the structure, expression and substrate-recognition properties of these proteases, it remains uncertain whether each caspase has a specific substrate for mediating apoptosis *in vivo* or if some of them are redundant, cleaving the same substrate. It is noteworthy that mice knocked-out for *CASP-1* (ICE) gene develop normally although their thymocytes demonstrate a specific resistance to Fas-mediated apoptosis (Kuida *et al.*, 1995) while *CASP-3*-deficient mice do not show any alteration of their thymocyte susceptibility to various apoptotic stimuli but show profound alterations of their brain development and die at 1–3 weeks of age (Kuida *et al.*, 1996). These results suggest that caspase-1 is specifically involved in Fas-mediated cell death while caspase-3 plays a major role in the normal development of some cells of the brain.

The epipodophyllotoxin etoposide (VP-16) is a topoisomerase II-reactive agent commonly used for the treatment of various human tumors. This cytotoxic drug produces DNA double-strand breaks by stabilizing a transient intermediate of the topoisomerase reaction (Pommier, 1997). These DNA damage are thought to be a critical event for etoposide cytotoxic activity. As many other cytotoxic drugs, etoposide kills tumor cells by inducing their apoptosis (Solary *et al.*, 1994). The ability of malignant cells to undergo apoptotic cell death following DNA damage is the ultimate determinant of their sensitivity to these drugs (Pommier *et al.*, 1994; Dubrez *et al.*, 1995). We have previously identified several steps in the proteolytic pathway that leads to apoptotic DNA fragmentation in human leukemic cells treated with etoposide (Dubrez *et al.*, 1996). We observed that a protease sensitive to the CED-3-like caspase tetrapeptide inhibitor DEVD played a central role in this pathway. The relation-

Correspondence: E Solary
Received 1 August 1997; revised 30 December 1997; accepted 30 December 1997

ships between the expression of *CASP* genes in tumor cells and their sensitivity to etoposide-induced apoptosis remained unknown. This question was addressed in the present study.

Results

Heterogeneous expression of CASP *genes in human leukemic cell lines*

Three groups of caspases have been identified, based on structural homologies (Alnemri *et al.*, 1996). We designed reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT–PCR) assays to study the expression of *CASP* genes in tumor cells. The studied *CASP* genes were selected in the three caspase groups and included: (1) the long and the short isoforms of *CASP-2* gene encoding procaspase-2L (ICH-1L) and procaspase-2S (ICH-1S) respectively (Wang *et al.*, 1994); (2) two *CASP* genes encoding CED3-related procaspases, namely *CASP-3* encoding procaspase-3 (CPP32/Yama/Apopain) (Fernandes Alnemri *et al.*, 1994; Tewari *et al.*, 1995; Nicholson *et al.*, 1995) and *CASP-6* encoding procaspase-6α (Mch-2α) (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1995a); and (3) *CASP-4* encoding the ICE-related procaspase-4 (ICH-2/TX/ICE_{rel}-II) (Kamens *et al.*, 1995; Faucheu *et al.*, 1995; Munday *et al.*, 1995) (Table 1). Their expression was first analysed in five human leukemic cell lines (BV173, HL60, U937, K562 and KCL22 cell lines) in exponential phase of growth without addition of any apoptosis-inducing agent (Figure 1a and b). The expression of each *CASP* gene was related to the *β2 microglobulin* gene expression measured in parallel in every cell line. Ethidium bromide staining of the agarose gel after migration of the PCR products identified a band of the expected size for each pair of primers (Figure 1a). The specificity of this amplification product was systematically confirmed both by hybridizing the generated band with a specific 30-mer oligonucleotide and by directly sequencing the band of the expected size (not shown). *CASP-4* gene expression was not detected in K562 cells. The expression of the other studied *CASP* genes was heterogeneous among

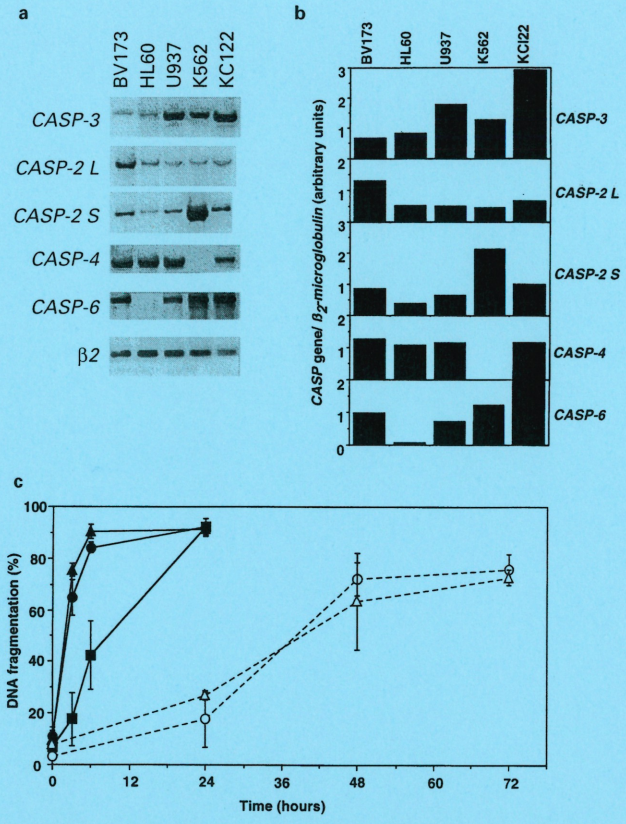


Figure 1 Expression of *CASP* genes in five human leukemic cell lines. Relationships with sensitivity to etoposide-induced apoptosis. (**a** and **b**) The expression of five *CASP* gene isoforms was studied in the five indicated human leukemic cell lines by using RT–PCR as described in Materials and methods. (**a**) Ethidium bromide staining of the PCR amplification products after agarose gel electrophoresis. The obtained signals were compared to the expression of the *β2 microglobulin* gene (*β2*) analysed in parallel. Results shown are one of at least three experiments performed with different RNA preparations (**b**) Histograms indicate the ratio of the *CASP* gene signal related to the *β2 microglobulin* signal expressed in arbitrary units. The lack of expression of *CASP-4* gene in K562 cells was confirmed by hybridization with a specific 30-mer oligonucleotide (not shown). (**c**) Apoptotic DNA fragmentation was measured by using a filter elution assay in the five studied cell lines (BV173: ●; HL60: ▲; U937: ■; K562: ○; KCL-22: △) treated with 100 μM VP16 for the indicated times. Results are the mean ± s.d. of three different experiments performed in triplicate

Table 1 Primers used for RT–PCR analysis of *CASP* genes in leukemic cells

Gene		*Primers*	*Amplified DNA fragment*
CASP-2 (Ich-1)	sense	5′-AATGTGGAACTCCTCAACTTGCTG-3′	813 bp
	antisense	5′-TCCATCTTGTTGGTCAACCCC-3′	
CASP-2L (Ich-1L)	sense	5′-ATGGCCGCTGACAGGGGACGC-3′	1308 bp
	antisense	5′-TCATGTGGGAGGGTGTCCTGGG-3′	
CASP-2S (Ich-1S)	sense	5′-ATGCATCCTCATCATCAGGAA-3′	939 bp
	antisense	5′-TCATAGAGCAAGAGAGGCGGT-3′	
CASP-3 (CPP32)	sense	5′-ATGGAGAACACTGAAAACTCA-3′	834 bp
	antisense	5′-TTAGTGATAAAAATAGAGTTC-3′	
CASP-4 (Tx/Ich-2/ICE_{rel}-II)	sense	5′-ATGGCAGAAGGCAACCACAGA-3′	1134 bp
	antisense	5′-TCAATTGCCAGGAAAGAGGTA-3′	
CASP-6 (Mch-2α)	sense	5′-ATGAGCTCGGCCTCGGGGCTC-3′	882 bp
	antisense	5′-TTAATTAGATTTTGGAAAGAA-3′	
β2 microglobulin	sense	5′-AAGTGGAGCATTCAGACTTGTC-3′	158 bp
	antisense	5′-CTTACATGTCTCGATCCCACTT-3′	

the tested cell lines (Figure 1a and b). For example, the short isoform of *CASP-2* was sixfold more expressed in K562 cells compared to HL60 cells and the expression of *CASP-6* was 28-fold lower in HL60 cells compared to KCL22 cells (Figure 1b). These results were highly reproducible from multiple mRNA preparations. The sensitivity of the studied cell lines to apoptotic DNA fragmentation induced by continuous exposure to 100 μM etoposide was measured by the use of a filter elution assay (Figure 1c). These experiments confirmed that K562 and KCL22 cell lines were less sensitive to etoposide-induced cell death than the three other studied cell lines (Dubrez *et al.*, 1995). No clear relationship was identified between the profile of expression of the studied *CASP* genes and the cell line sensitivity to etoposide-induced apoptosis.

Heterogeneous expression of CASP *genes in clinical bone marrow samples from* de novo *acute myelogenous leukemias*

We checked whether the heterogeneous expression of *CASP* genes identified in leukemic cell lines was also observed in bone marrow samples from patients with *de novo* acute myeloblastic leukemia (AML). We selected three *CASP* gene isoforms whose expression was determined by RT–PCR amplification in fifteen AML bone marrow samples, two bone marrow samples obtained from healthy donors and the human leukemic cell line U937 (Figure 2a and b). Results were analysed on ethidium bromide-stained agarose gel after migration of PCR amplification products (Figure 2a) and confirmed by hybridization with specific 30-mer oligonucleotides (not shown). The *β2 microglobulin* gene expression was studied in parallel and the ratio of the expression of each *CASP* gene to the expression of the *β2 microglobulin* gene was determined for every sample studied (Figure 2b). These experiments indicated that the expression of *CASP* genes was also heterogeneous in clinical samples from patients with AML. *CASP-3* gene was more expressed in U937 cells and in most AML bone marrow samples studied than in the two normal bone marrow samples. Conversely, the expression of the short isoform of *CASP-2* gene was lower in U937 cells and in a majority of clinical AML samples compared to normal bone marrow.

Etoposide effects on the expression of CASP *genes and the appearance of apoptotic markers in U937 cells*

To determine whether the expression of caspases was regulated at the mRNA level during etoposide-induced apoptosis, we studied the kinetics of *CASP-3*, *CASP-2L* and *CASP-2S* gene expression in U937 cells treated with 50 μM etoposide. The expression of *CASP* genes either remained stable (*CASP-2L*) or increased (*CASP-2S* and CASP-3) during the first hours of drug exposure (Figure 3a), before the appearance of apoptotic markers. Procaspase-2L protein level decreased while procaspase-2S accumulated in parallel with the related *CASP* gene isoform mRNA. Apoptosis markers included the activation of procaspase-3 whose level decreased when caspase-3-p19 and caspase-3-p17 active fragments appeared simultaneously with the cleavage of the p116 PARP protein into a 85 kDa fragment (Figure 3b) and the appearance of a DNA ladder (Figure 3c). Starting with the occurrence of these markers, *CASP* gene expression decreased progressively until complete disappearance in ethidium bromide-stained agarose gel, 24 h after the beginning of drug exposure, when the majority of cells are apoptotic (Dubrez *et al.*, 1995).

Differential modulation of CASP *gene expression in HL60 and K562 cells*

In HL60 cells, which are as sensitive to etoposide-induced apoptosis as U937 cells, continuous exposure to 50 μM etoposide also increased the expression of

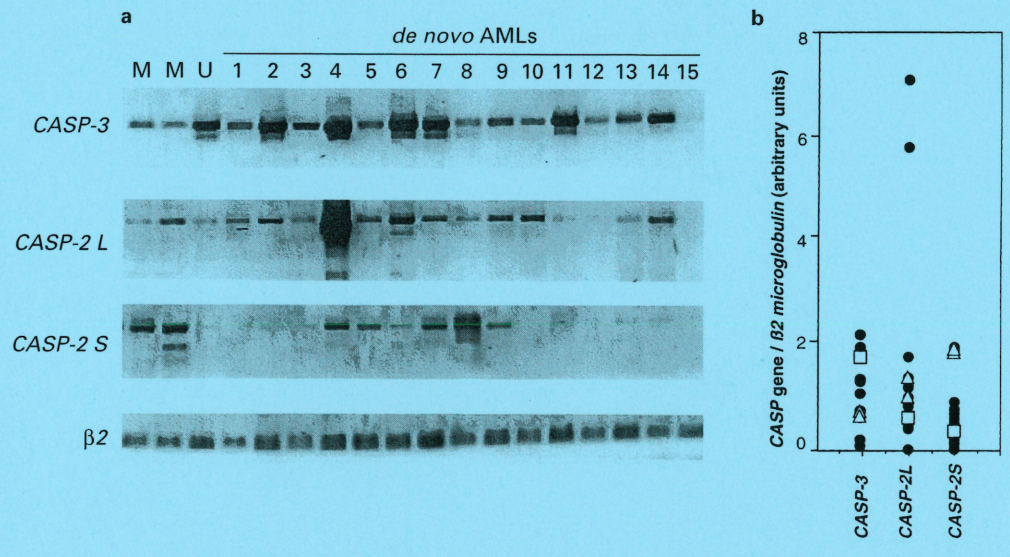


Figure 2 Expression of *CASP* genes in clinical bone marrow samples from *de novo* acute myelogenous leukemias. (**a**) Ethidium bromide staining of agarose gels after migration of indicated PCR amplification products obtained from two bone marrow samples from healthy donors (M), the U937 cell line (U) and 15 bone marrow samples from patients with *de novo* acute myelogenous leukemia at diagnosis. Results shown are one of three experiments performed with different RNA preparations (**b**) Expression of the studied *CASP* genes, expressed as the ratio of the specific *CASP* signal to the *β2 microglobulin* signal (arbitrary units) in the two normal bone marrow samples (△), U937 cells (□) and the 15 studied clinical samples (●)

both *CASP-2S* and *CASP-3* genes. In this cell line, *CASP-2L* mRNA level also increased during the first hours of drug exposure (Figure 4). In the K562 cell line, that was much less sensitive to etoposide-induced apoptosis as compared to U937 and HL60 cells, the expression of the three studied *CASP* gene isoforms remained stable during the first 48 h exposure to 100 μM etoposide (Figure 4).

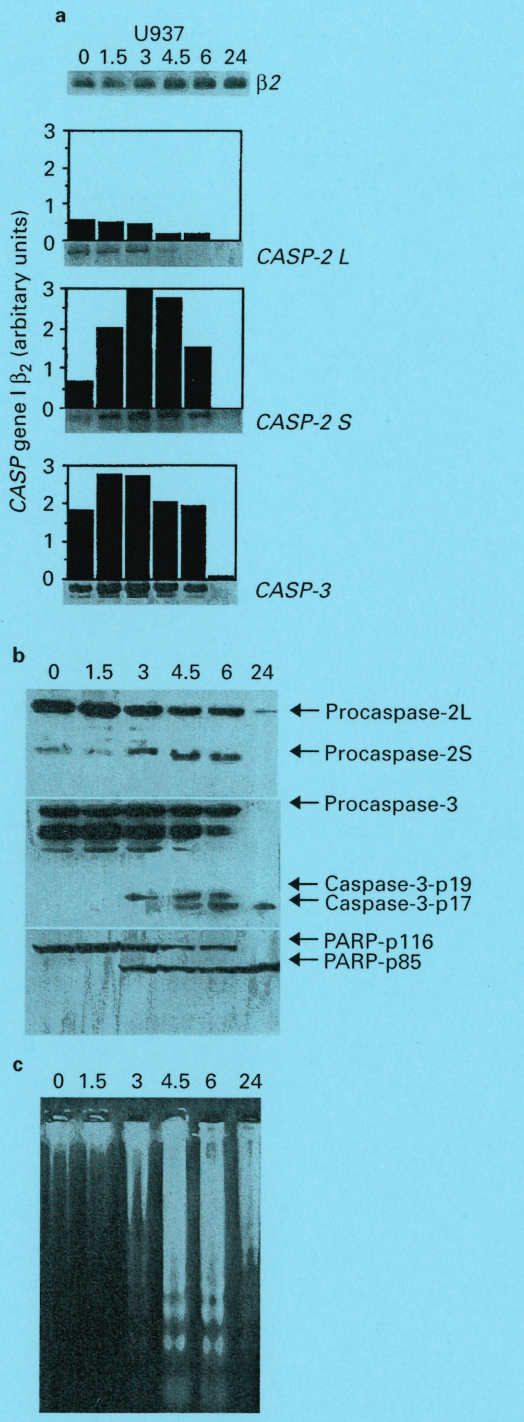


Figure 3 Expression of *CASP* genes, activation of procaspases, PARP cleavage and apoptotic DNA fragmentation in etoposide-treated U937 cells: U937 cells were treated for indicated times with 50 μM etoposide. (**a**) RT–PCR analysis of the expression of indicated *CASP* genes. Ethidium bromide-stained PCR amplification products after agarose gel electrophoresis are shown. *β2 microglobulin* gene expression was used as an internal standard to measure the *CASP* to *β2 microglobulin* gene expression ratio from these gels. Results shown are one of three experiments performed with different RNA preparations (**b**) Western blot analysis of procaspase-2L and procaspase 2S, procaspase-3 and its cleavage products (caspase-3-p19 and caspase-3-p17) and poly(ADP-ribose)polymerase (PARP-p116) and its cleavage product (PARP-p85) in U937 cells. (**c**) Agarose gel electrophoresis of DNA obtained from etoposide-treated U937 cells

CASP *gene expression increase correlates with procaspase accumulation in the HT29 human colon carcinoma cell line*

Human leukemic cells are cultured as floating cells. When exposed to etoposide at concentrations that induce apoptosis, dead cells cannot be easily separated from non-apoptotic cells. To compare the expression of *CASP* genes and procaspases in non-apoptotic and apoptotic cells, we used the HT29 human colon carcinoma cell line. These cells grow attached in culture flasks and detach when undergoing apoptotic cell death under etoposide exposure. In attached cells, etoposide exposure induced a progressive accumulation of *CASP-2S*, *CASP-2L* and *CASP-3* mRNAs (Figure 5a, left and middle panels). Increased expression of *CASP* genes in these cells correlated with an accumulation of the related proteins that reached a maximum between 24 and 48 h of drug exposure (Figure 5a, right panels). In detached cells (Figure 5d), the expression of both *CASP* genes and procaspases decreased while the caspase-3-p19 and caspase-3-p17 active fragments appeared.

Effects of bcl-2 *gene overexpression upon* CASP *gene expression in etoposide-treated U937 cells*

To further analyse the relationship between cell sensitivity to drug-induced cell death and *CASP* gene

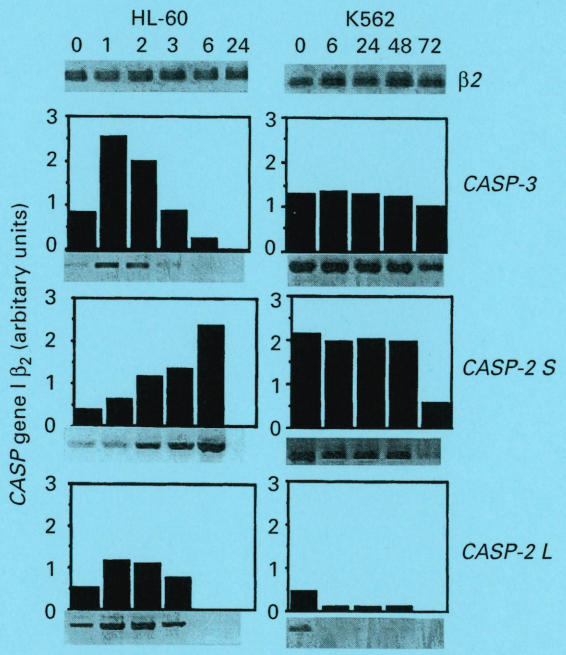


Figure 4 Expression of *CASP* genes in HL60 and K562 cell lines treated with etoposide: HL60 and K562 cells were treated for indicated times with 50 and 100 μM etoposide, respectively. Ethidium bromide-stained PCR amplification products after agarose gel electrophoresis are shown. *β2 microglobulin* gene expression was used as an internal standard to measure the *CASP* to *β2 microglobulin* gene expression ratio from these gels. Results shown are onw of three experiments performed with different RNA preparations

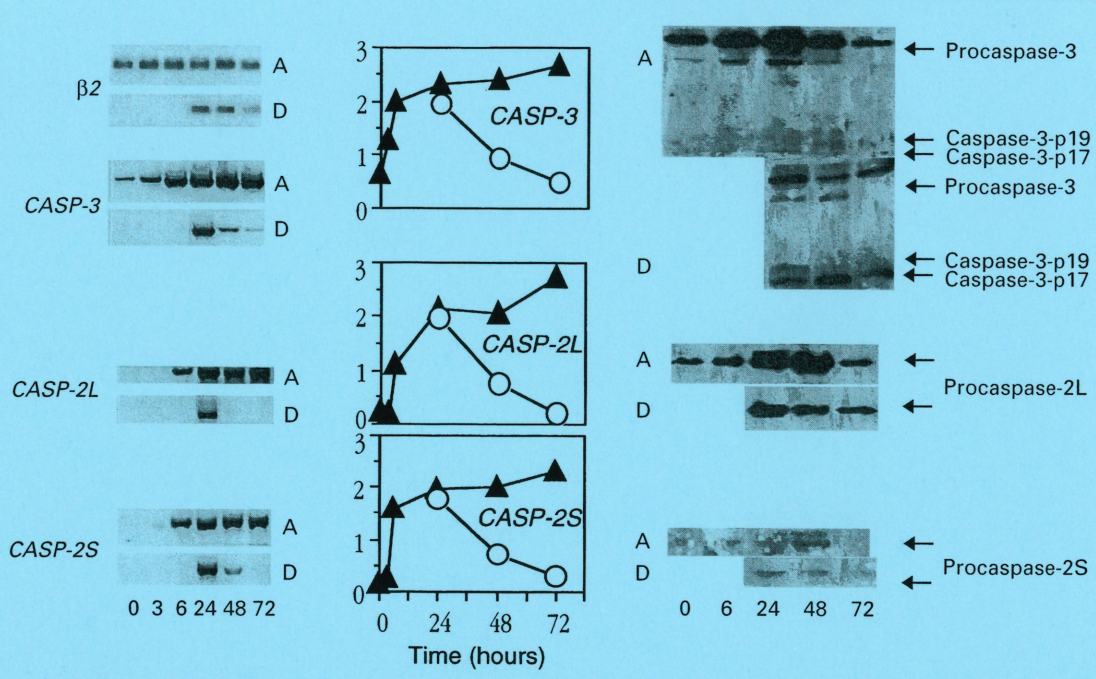


Figure 5 Expression of *CASP* genes and procaspases in etoposide-treated HT29 cells: HT29 human colon carcinoma cells were treated for indicated times with 50 μM etoposide. *Left panels*: RT–PCR analysis of the expression of indicated *CASP* genes in attached (A) and detached (D) cells. Ethidium bromide-stained PCR amplification products after agarose gel electrophoresis are shown. *Middle panels*: *β2 microglobulin* gene expression was used as an internal standard to measure the *CASP* to *β2 microglobulin* gene expression ratio from these gels. Results shown are one of two experiments performed with different RNA preparations. *Right panels*: Western blot analysis of procaspase-2L, procaspase 2S and procaspase-3 and its cleavage products (caspase-3-p19 and caspase-3-p17) in attached (A) and detached (D) etoposide-treated HT29 cells

upregulation, we tested the effect of BCL-2 protein overexpression on etoposide-mediated *CASP* genes modulation. BCL-2 protein has been demonstrated to inhibit apoptosis downstream of specific DNA damage induced by topoisomerase inhibitors (Kamesaki *et al*., 1993) and upstream of the activation of CED-3-like procaspases (Chinnaiyan *et al*., 1996; Meisenholder *et al*., 1996). To address the question whether overexpression of BCL-2 could modify *CASP* gene modulation in etoposide-treated cells, we transfected *bcl-2* gene in the U937 cell line. One of the clones (U4) in which BCL-2 protein was clearly overexpressed (Renvoizé *et al*., 1997) was selected for further experiments. Overexpression of BCL-2 protein significantly delayed procaspase-3 activation into caspase-3-p19 and caspase-3-p17 fragments, PARP cleavage into its p85 fragment and apoptotic DNA fragmentation occurrence (Figure 6b and c). In etoposide-treated U4 cells, BCL-2 overexpression prevented both *CASP-2S and CASP-3* mRNA level increase that occurs during the first hours of treatment in the parental U937 cells (Figure 6a).

Mechanisms of CASP *gene modulation in etoposide-treated U937 cells*

Nuclear run-on transcription experiments, performed in etoposide-treated U937 cells, demonstrated that the transcription of the short isoform of the *CASP-2* gene was about sixfold increased when studied 4.5 h after cell exposure to 50 μM etoposide. Transcription of two other studied *CASP* genes, namely *CASP-3* and *CASP-6*, also increased, although more slightly, in response to etoposide exposure (Figure 7a). This treatment did not modify *α-actin* and *Bcl-X_L* gene transcription (Figure 7a). The same experiments were performed in the U4 clone that overexpresses BCL-2 protein. These experiments demonstrated that BCL-2 overexpression prevented *CASP-2s* and *CASP-3* upregulation in these cells (Figure 7b).

The permanent peptides Z-VAD-CH2F and Z-DEVD-CH2F, which are homologous to sequences specifically targeted by ICE-like caspases and CED-3-like caspases, respectively, both prevented etoposide-induced apoptotic DNA fragmentation and PARP cleavage in etoposide-treated U937 cells (Dubrez *et al*., 1996). Both Z-VAD and Z-DEVD peptides also efficiently suppressed *CASP* gene expression decrease associated with the cell death process in etoposide-treated U937 cells (Figure 8).

Discussion

The basal level of several *CASP* mRNAs was analysed for the first time in a series of human leukemic cell lines and bone marrow samples from patients with *de novo* AML. It was previously shown that human *CASP* genes co-expressed in a variety of tissues (Wang *et al*., 1994). These genes are more expressed in embryonic compared to adult tissues and are poorly expressed in adult brain compared to any other adult tissue (Fernandes-Alnemri *et al*., 1994, 1995b, 1996; Kamens *et al*., 1995; Munday *et al*., 1995; Duan *et al*., 1996; Duan and Dixit, 1997). In the human HL60 leukemic cell line, RT–PCR identified transcripts for at least nine different caspases (Martins *et al*., 1997). Here, we confirm coexpression of *CASP* genes from various

groups of caspases in tumor cells. We show that the basal mRNA level of the tested *CASP* genes is very heterogeneous from one cell line to another and from one patient to another. The expression of each *CASP* gene seems to be independent of that of other *CASP* genes since no correlation was observed between them

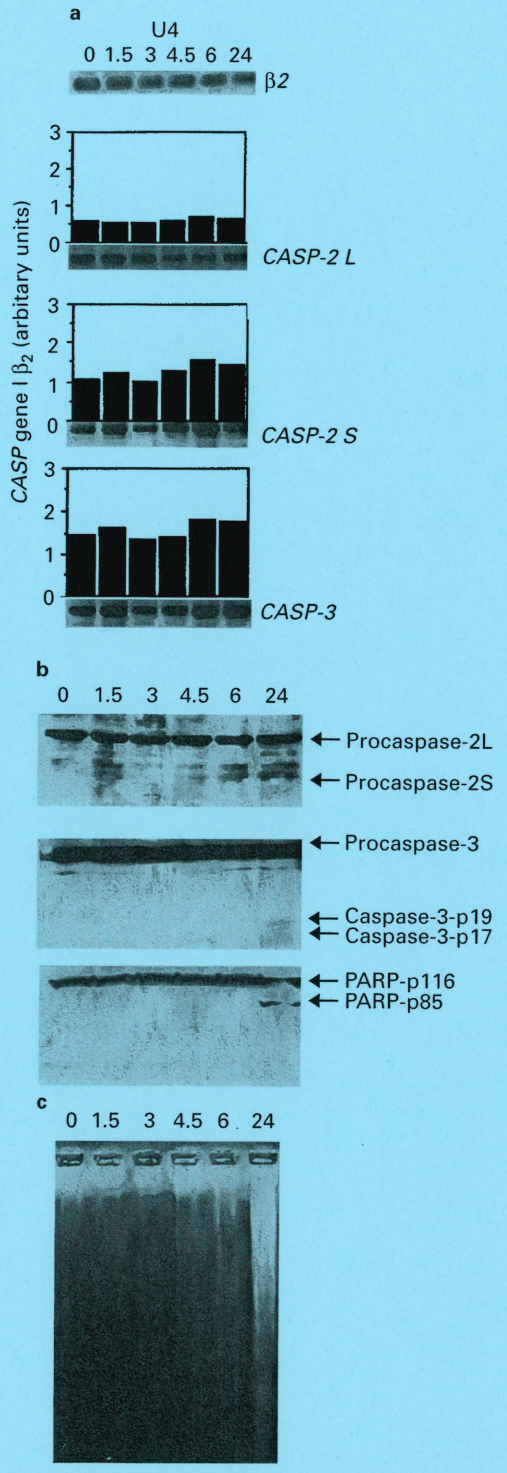


Figure 6 Expression of *CASP* genes, activation of procaspases, PARP cleavage and apoptotic DNA fragmentation in etoposide-treated U4 cells: U4 cells, that overexpress Bcl-2 protein, were treated for indicated times with 50 μM etoposide. (**a**) RT–PCR analysis of the expression of indicated *CASP* genes. Ethidium bromide-stained PCR amplification products after agarose gel electrophoresis are shown. *β2 microglobulin* gene expression was used as an internal standard to measure the *CASP* to *β2 microglobulin* gene expression ratio from these gels. Results shown are one of three experiments performed with different RNA preparations. (**b**) Western blot analysis of procaspase-2L and procaspase 2S, procaspase-3 and its cleavage products (caspase-3-p19 and caspase-3-p17) and poly(ADP-ribose)polymerase (PARP-p116) and its cleavage product (PARP-p85) in U4 cells. (**c**) Agarose gel electrophoresis of DNA obtained from etoposide-treated U4 cells

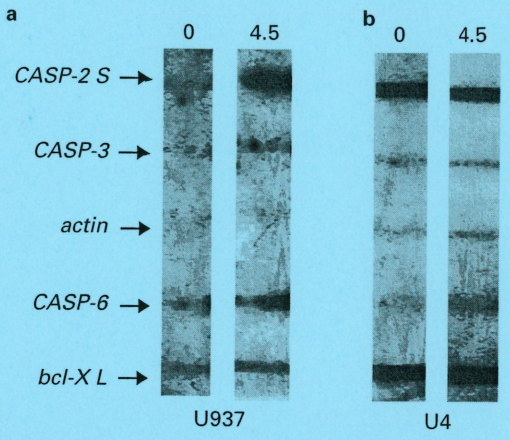
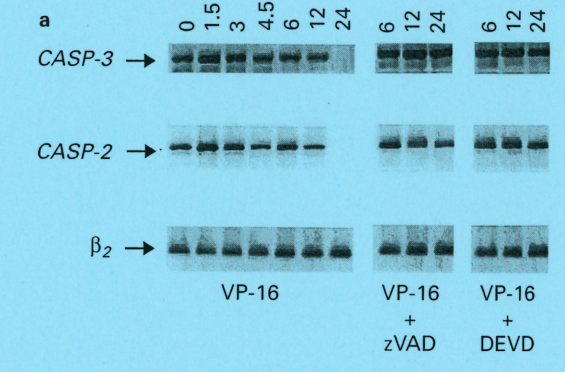


Figure 7 Transcription of *CASP* genes in etoposide-treated U937 and U4 cell: Nuclear run-on assay measuring the transcription of indicated genes in untreated (left panels) and etoposide-treated (right panels, 50 μM for 4.5 h) U937 (**a**) and U4 (**b**) cells



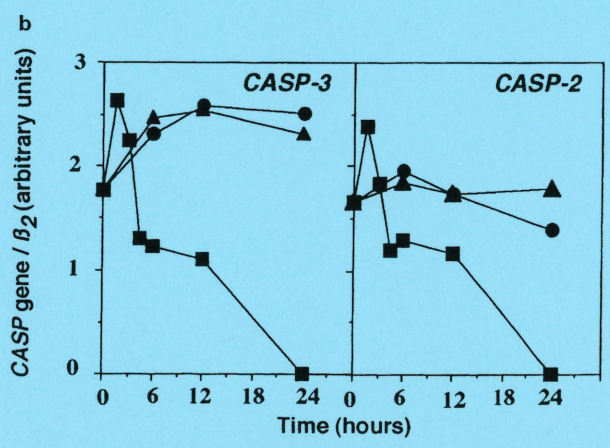


Figure 8 Influence of tetrapeptide inhibitors Z-VAD and Z-DEVD upon etoposide-induced *CASP* genes modulation in U937 cells. (**b**) U937 cells were treated with 50 μM etoposide for the indicated times (hours) in the absence (■) or in the presence of Z-VAD-CH2F (●) or Z-DEVD-CH2F (▲) permanent inhibitors. (**a**) Ethidium bromide-stained PCR amplification products after agarose gel electrophoresis. *β2 microglobulin* gene expression was used as a control. (**b**) *CASP* gene to *β2 microglobulin* gene ratio was measured from the gels shown on **a**. Results shown are one of two experiments performed with different RNA preparations

in the fifteen tested clinical samples and the five leukemic cell lines.

CASP-3 gene, that encodes a pro-apoptotic protease (Fernandes-Alnemri *et al*., 1994; Tewari *et al*., 1995; Nicholson *et al*., 1995), was generally more expressed in fresh leukemic cells and U937 cells compared to normal bone marrow samples. Conversely, the short isoform of *CASP-2*, that encodes an anti-apoptotic protein (Wang *et al*., 1994), was less expressed in leukemic cells than in normal cells. Among the four genes whose expression was analysed in leukemic cell lines, only one, *CASP-4*, was not detected in one cell line, K562. The low sensitivity of K562 cells to a variety of apoptotic stimuli has been previously related to *bcr–abl* overexpression (McGahon *et al*., 1994). By analogy with thymocytes from *CASP-1*-null mice which show defective Fas-mediated apoptosis (Kuida *et al*., 1995), the lack of *CASP-4* gene expression could contribute to the low sensitivity of K562 cells to apoptotic stimuli. Actually, no clear relationship was identified between the ability of leukemic cell lines to undergo apoptosis when treated with etoposide and the basal expression of the studied *CASP* genes in these cells. Several reasons could account for this lack of correlation. First, leukemic cell sensitivity to drug-induced cell death could be regulated upstream of procaspase activating cleavage, for example by the BCL-2 family of proteins (Chinnayian *et al*., 1996; Meisenholder *et al*., 1996; Armstrong *et al*., 1996; Monney *et al*., 1996) and other oncogenes (McGahon *et al*., 1994; Chapman *et al*., 1994). Second, functional redundancy in the substrate recognition of caspases could protect the cells from the consequences of the deletion of one or several *CASP* genes (Kumar *et al*., 1994). For example, PARP can be cleaved *in vitro* by a variety of caspases including caspase-1, -2, -3, -4, -6, -7 and -8 although cleavage by caspase-1, -2 and -4 appears to require high enzyme concentrations (Kaufmann *et al*., 1993; Nicholson *et al*., 1995; Fernandes-Alnemri *et al*., 1995b; Gu *et al*., 1995a). Third, heterodimerization between pro-apoptotic and anti-apoptotic isoforms of caspases (Gu *et al*., 1995b); alternative processing of the proenzymes (Alnemri *et al*., 1995) and/or posttranslational modifications of the processed subunits Martins *et al*., 1997) rather than *CASP* gene mRNA level could determine whether a cell live or die by apoptosis in response to a given stimulus. For example, two-dimensional analysis identified multiple forms of procaspase-3 during etoposide-induced apoptosis in the human leukemic cell line HL60 (Martins *et al*., 1997).

Upregulation of the *Nedd2* gene, the mouse *CASP-2S* gene, has been recently described in an *in vivo* model of neuronal cell death (Kinoshita *et al*., 1997). The present study suggests a relationship between enhanced expression of several *CASP* genes and cell sensitivity to etoposide-induced apoptosis. In U937 cells, upregulation of *CASP-2S* and *CASP-3* mRNA is related to an increased transcription of these genes that precedes the appearance of apoptotic markers. This upregulation is prevented by BCL-2 protein over-expression. BCL-2 (Chinnayian *et al*., 1996) was shown to delay etoposide-induced apoptotic cell death by preventing the activation of CED-3-like caspases. Our results suggest that this protein could also prevent the activation of one or several transcriptional factors that regulate the expression of *CASP* and other apoptosis-related genes. A role for transcriptional factors in apoptosis regulation has been suggested both in the nematode *Caenorrhabditis elegans* (Metzstein *et al*., 1996) and in mammals (Inaba *et al*., 1996). The process of cell death induced by the p53 tumor suppressor was shown to activate eight cDNAs in the mouse M1 myloid leukemia cell line (Amson *et al*., 1996). We reported recently that increased transcription of the *gadd153* gene, observed in etoposide-treated U937 cells undergoing apoptosis, was prevented by overexpression of BCL-2 (Eymin *et al*., 1997). A good correlation was found between the extent of cellular injury and treatment-induced increase in *gadd153* mRNA level (Gately *et al*., 1996). Our results suggest that the ability of tumor cells to upregulate the expression of *CASP* genes in response to a cytotoxic drug could be predictive of their sensitivity to this drug.

The cell death process itself is associated with a downregulation of *CASP* gene expression. In etoposide-treated U937 cells, the permeant peptides Z-VAD-CH2F and Z-DEVD-CH2F prevent apoptotic DNA fragmentation and PARP cleavage (Dubrez *et al*., 1996; Slee *et al*., 1996). These peptides suppress *CASP*-mRNA degradation associated with the cell death process without inhibiting *CASP-3* gene upregulation in etoposide-treated U937 cells. This observation suggests that factors that increase the transcription of some *CASP* genes in etoposide-treated cells are not activated by caspases.

Multiple procaspases are present in human tumor cells prior to the application of an apoptotic stumulus. This stimulus could either activate proteases from preexisting proenzymes or trigger *de novo* synthesis of additional procaspases. Whether increased transcription of some *CASP* genes and the accumulation of the related procaspases are necessary for the apoptotic process to occur remains to be demonstrated. Treatment of HL60 cells with concentrations of cycloheximide and puromycin that inhibit most protein synthesis induces apoptotic cell death, suggesting that *de novo* protein synthesis is not always necessary for apoptosis to occur (Martins *et al*., 1977). In U937 cells treated with etoposide, we observed an accumulation of procaspase-2S that preceded the appearance of apoptosis markers. By the use of the HT29 cell line that grows attached to the plastic flask and detach when undergoing apoptosis, we were able to separate pre-apoptotic from apoptotic cells. Etoposide-treated HT29 cells accumulated both *CASP* genes and caspase proenzymes before detaching from the flask. Interestingly, procaspase-2S, that encodes an antiapoptotic protein, was upregulated in both U937 and HT29 cells. One hypothesis is that, in response to apoptotic stimuli, cells accumulate caspases that are neutralized by heterodimerization of proapoptotic with antiapoptotic subunits until the start of the apoptotic process.

Altogether, the present study points out the heterogeneous expression of *CASP* genes in human tumor cells and suggests that cells that are sensitive to etoposide-induced cell death upregulate *CASP-2* and *CASP-3* gene expression and synthesize the corresponding procaspases before showing significant apoptotic proteolysis and DNA fragmentation.

Materials and methods

Drug and chemicals

[2-^{14}C]thymidine (50 mCi/mmol) was obtained from Amersham (Les Ulis, France). The tetrapeptide inhibitors Z-Val-Ala-Asp-CH2F (Z-VAD) and Z-Asp-Glu-Val-Asp-CH2F (Z-DEVD) were synthetized by Enzyme System Products (Dublin, CA). Oligonucleotides were synthetized by Eurogentec (Angers, France). Etoposide and other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich laboratories (St Quentin Fallavier, France).

Cells, cell culture and transfection

The human leukemic cell lines BV173, HL60, U937, K562 and KCL22 were grown in suspension in RPMI 1640 medium (BioWhittaker, Fontenay-sous-bois, France) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal bovine serum and 2 mM L-glutamine in an atmosphere of 95% air and 5% CO_2. Cell viability was determined using the trypan blue exclusion assay. Etoposide stock solution (20 mM), prepared by diluting the drug in dimethyl sulphoxide (DMSO), was conserved at −20°C for less than 1 month. The final concentration of DMSO in the culture medium never exceed 1% (vol/vol), which was non toxic to the cells. Cells were resuspended at a density of 1.5×10^6/ml in fresh medium before treatment. Bone marrow leukemic cells were obtained with informed consent from patients with *de novo* acute myelogenous leukemia at diagnosis, before initiation of any treatment. Samples were sent by overnight mail for immediate RNA extraction and cDNA preparation. Normal bone marrow was obtained from healthy donors with informed consent. Blast cells and normal bone marrow mononuclear cells were isolated on ficoll-hypaque (Eurobio, France).

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

RT–PCR was performed as previously described (Koos and Seidel, 1989). Total RNA was isolated with RNA Plus™ (Bioprobe Systems, Montreuil-sous-bois, France) from either different leukemic cell lines treated or not with etoposide or bone marrow samples from patients with AML. RNA was reverse transcribed by M-MLV reverse transcriptase (Gibco, Cergy Pontoise, France) with random primers (pdN6, Boerhinger-Manheim, Germany). Sense and anti-sense primers used to amplify human *CASP* and *β2 microglobulin* genes as well as the size of amplified products are indicated in Table 1. For each studied gene, primers were located in separate exons in genomic DNA so that we could eliminate the possibility of genomic DNA contamination. The following conditions were used for the PCR reactions: 1 × reaction buffer (Eurobio, Les Ulis, France), 1.5–2.5 mM $MgCl_2$ optimized according to each pair of primers, 200 μM dNTP, 1 μM of each primer and 2.5 U of Taq DNA polymerase (Eurobio, Les Ulis, France) in a total volume of 50 μl. DNA was denatured for 1 min at 94°C prior to 29–38 PCR cycles, depending of the primer used. Amplification was carried out on a PTC 150 (Prolabo, Fontenay-sous-bois, France). The PCR products were analysed on 1.2% agarose gels. The amplified DNA was stained with ethidium bromide and the fluorescence intensity was detected by video camera and measured using Phoretix 1D software (Phoretix-International, Newcastle, England). All the results were normalized with the expression of the *β2 microglobulin* gene.

Nuclear run-on assay

The relative transcription rates of *CASP-2*, *CASP-3* and *CASP-6* genes was studied in etoposide-treated U937 cells by the use of a previously described method (Srivastava *et al*., 1993). Briefly, untreated and etoposide-treated (50 μM for 3 h) U937 cells were lysed in a lysis buffer (Tris-HCl, 10 mM, pH 7.4, NaCl 10 mM, $MgCl_2$ 3 mM NP-40 0.5%) and nuclei were harvested by centrifugation. For run-on reactions, 200 μl of a 2× reaction mixture (Tris-HCl, 10 mM, pH 8.0, KCl 300 mM, $MgCl_2$ 5 mM, ATP 1 mM, CTP 1 mM, GTP 1 mM, dithiothreitol 5 mM) and 100 μCi of [^{32}P]UTP were added to 1×10^7 nuclei and incubated at 25°C for 25 min. RNA was extracted by mixing the nuclear suspension with 400 μl of RNAzol and equal counts per minute were hybridized with appropriate cDNA on nitrocellulose at 65°C for 36 h before autoradiography.

Quantification of DNA fragmentation

DNA fragmentation was measured using a previously reported filter elution assay (Solary *et al*., 1993). Exponentially growing cells were pre-labelled by adding 0.02 μCi/ml of [2-^{14}C]thymidine in the culture medium for 2 days. Then, cells were chased in isotope-free medium overnight. Approximately 1.0×10^6 ^{14}C-labelled cells or ^{14}C-labelled nuclei were loaded onto a protein absorbing filter (Polyvinylidene fluorure filters, 0.65 μm pore size, 25 mm diameter; Durapore membrane, Millipore, St Quentin, France). Cells or nuclei were then washed once with 5 ml of ice-cold PBS. Lysis was subsequently performed with 5 ml of LS10 buffer (0.2% sodium sarkosyl, 2 M NaCl, 0.04 M EDTA, pH 10.0). Filters were washed with 7 ml of 0.02 M EDTA, pH 10. DNA was depurinated by adding 0.4 ml of 1N HCl at 65°C for 45 min, then released from the filters by adding 2.5 ml of 0.4 N NaOH for 45 min at room temperature. Radioactivity was counted by liquid scintillation spectrometry in each fraction (wash, lysis, EDTA wash and filter). DNA fragmentation was measured as the fraction of d.p.m. in the lysis fraction plus EDTA wash relative to the total intracellular d.p.m.

Analysis of DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis

Cellular DNA from whole cells or isolated nuclei was extracted by a salting-out procedure as described previously (Miller *et al*., 1988). Electrophoresis was performed in a 1.8% agarose gel in Tris-borate-EDTA buffer (pH 8) at 20 Volts for 15 h. After electrophoresis, DNA was visualised by ethidium bromide staining.

Western blot analysis

After treatment, cells were washed twice in PBS, lysed in lysis buffer (150 mM NaCl, 1 mM KH_2PO_4, 1 mM EGTA, 1 mM Na_3VO_4, 5 mM $MgCl_2$ and 10% glycerol containing PmsF 0.1 mM, Aprotinin 0.15 U/ml, Pepstatin 1 μg/ml) and centrifugated for 15 min at 15 000 g. Fifty μg proteins of supernatants (Smith *et al*., 1985) were separated by SDS–PAGE using a 12% polyacrylamide gel and electroblotted to PVDF membrane (BioRad, Ivry-sur-Seine, France). After blocking non-specific binding sites overnight by 5% nonfat milk in TPBS (PBS, Tween 20 0.1%), the membrane was incubated for 2 h at room temperature with anti-human procaspase-2 monoclonal antibody that recognizes both the long and the short isoforms of the protein (Transduction laboratories, Lexington, KY), washed twice with TPBS, further incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (Jackson ImmunResearch Laboratories, West Grove, PE) for 30 min at room temperature and washed twice with TBPS. Immunoblot was revealed using enhanced chemioluminescence detection kit (Amersham, Les Ulis, France) by autoradiography. For PARP and procaspase-3 cleavage analyses, cells were lysed in SDS–PAGE sample buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% β-mercaptoethanol, 4.6% SDS, 20% glycerol and 0.003% bromophenol

blue) and cell lysates were subjected to SDS–PAGE on a 8% polyacrylamide gel. The 116 kDa native PARP protein and its 85 kDa cleavage product were detected by immunoblotting with anti-human PARP polyclonal antibody (Vic. 5, kindly given by Dr G De Murcia) and horseradish-peroxidase conjugated anti-rabbit antibody (Amersham, Les Ulis, France) as described above. A rabbit polyclonal anti-caspase-3-p17 antibody (kindly provided by Dr D Nicholson) that recognizes both procaspase-3 and its p19 and p17 subunits (Schlegel *et al.*, 1996) was used to detect procaspase-3 activation in apoptotic U937 cells.

Acknowledgements

The authors wish to thank Sylvie Chevillard, Patricia de Crémoux and the GOELAMS group for providing cDNA from clinical samples, David Nicholson and Gilbert De Murcia for kindly providing anti-CPP32 and anti-PARP antibodies. We thank also François Martin and Carmen Garrido for their critical reading of the manuscript. This work was supported in part by grants by ARC (Grant 4075, ES), the Burgundy, Saône et Loire and Yonne Comittees of the Ligue Nationale Contre le Cancer and the Conseil Régional de Bourgogne.

References

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW and Yuan J. (1996). *Cell,* **87,** 171.

Alnemri ES, Fernandes-Alnemri T and Litwack G. (1995). *J. Biol. Chem.,* **270,** 4312–4317.

Amson RB, Nemani M, Roperch JP, Israeli D, Bougueleret L, Le Gall I, Medhioub M, Linarez-Cruz G, Lethrosne F, Pasturaud P, Piouffre L, Prieur S, Susini L, Alvaro V, Millasseu P, Guidicelli C, Bui H, Massart C, Cazes L, Dufour F, Bruzzoni-Giovanelli H, Owadi H, Hennion C, Charpak G, Dausset J, Calvo F, Oren M, Cohen D and Telerman A. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **93,** 3953–3957.

Armstrong RC, Aja T, Xiang J, Gaur S, Krebs JF, Hoang K, Bai X, Korsmeyer SJ, Karanewsky DS, Fritz LC and Tomaselli KJ. (1996). *J. Biol. Chem.,* **271,** 16850–16855.

Chapman RS, Whetton AD and Dive C. (1994). *Cancer Res.,* **54,** 5131–5137.

Chinnaiyan AM, Orth K, O'Rourke K, Duan H, Poirier GG and Dixit VM. (1996). *J. Biol. Chem.,* **271,** 4573–4976.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR and Dixit VM. (1997). *Science,* **275,** 1122–1126.

Duan H, Chinnaiyan AM, Hudson PL, Wing JP, He WW and Dixit VM. (1996). *J. Biol. Chem.,* **271,** 1621–1625.

Duan H, Chinnaiyan AM, Hudson PL, Wing JP, He WW and Dixit VM. (1996). *J. Biol. Chem.,* **271,** 1621–1625.

Duan H and Dixit VM. (1997). *Nature,* **385,** 86–90.

Dubrez L, Goldwasser F, Genne P, Pommier Y and Solary E. (1995). *Leukemia,* **9,** 1013–1024.

Dubrez L, Hammann A, Savoy I and Solary E. (1996). *EMBO J.,* **15,** 5504–5512.

Erhardt P and Cooper JM. (1996). *J. Biol. Chem.,* **30,** 17601–17604.

Eymin B, Dubrez L, Allouche M and Solary E. (1997). *Cancer Res.,* **57,** 686–695.

Faucheu C, Diu A, Chan AWE, Blanchet AM, Miossec C, Hervé F, Collard-Dutilleul V, Gu Y, Aldape RA, Lippke JA, Rocher C, Su MSS, Livingston DJ, Hercend T and Lalanne JL. (1995). *EMBO J.,* **14,** 1914–1922.

Fernandes-Alnemri T, Litwack G and Alnemri ES. (1995a). *Cancer Res.,* **55,** 2737–2742.

Fernandes-Alnemri T, Takahashi A, Armstrong R, Krebs J, Fritz L, Tomaselli KJ, Wang L, Yu Z, Croce CM, Salveson G, Earnshaw WC, Litwack G and Alnemri ES. (1995b). *Cancer Res.,* **55,** 6045–6052.

Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaseli KJ, Litwack G and Alnemri ES. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **93,** 7404–7409.

Fernandes-Alnemri T, Litwack G and Alnemri ES. (1994). *J. Biol. Chem.,* **269,** 30761–30764.

Gately DP, Sharma A, Christen RD and Howell B. (1996). *Br. J. Cancer,* **73,** 18–23.

Greidinger EL, Miller DK, Yamin TT, Casciola-Rosen L and Rosen A. (1996). *FEBS Lett.,* **390,** 299–303.

Gu Y, Sarnecki C, Aldape RA, Livingston DJ and Su MSS. (1995a). *J. Biol. Chem.,* **270,** 18715–18718.

Gu Y, Wu J, Faucheu C, Lalanne JL, Diu A, Livingston DJ and Su MSS. (1995b). *EMBO J.,* **14,** 1923–1931.

Hengartner MO and Horvitz HR. (1994a). *Curr. Opin. Genet. Dev.,* **4,** 581–586.

Hentgartner MO and Horvitz HR. (1994b). *Cell,* **76,** 665–676.

Inaba T, Inukai T, Yoshihara T, Seyschab H, Ashmun RA, Canman CE, Laken SJ, Kastan MB and Look AT. (1996). *Nature,* **382,** 541–544.

Kamens J, Paskind M, Hugunin M, Talanian RV, Allen H, Banach D, Bump N, Hackett M, Johnston CG, Li P, Mankovich JA, Terranova M and Ghayur T. (1995). *J. Biol. Chem.,* **270,** 15250–15256.

Kamesaki S, Kamesaki H, Jorgensen TJ, Tanizawa A, Pommier Y and Cossman J. (1993). *Cancer Res.,* **53,** 4251–4256.

Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE and Poirier GG. (1993). *Cancer Res.,* **53,** 3976–3985.

Kinoshita M, Tomimoto H, Kinoshita A, Kumar S and Noda M. (1997). *J. Cer. Blood Flow Metab.,* **17,** 507–515.

Koos RD and Seidel RH. (1989). *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **165,** 82–88.

Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS and Flavell RA. (1995). *Science,* **267,** 2000–2002.

Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan CY, Yang D, Karasuyama H, Rakic P and Flavell RA. (1996). *Nature,* **384,** 368–372.

Kumar S, Kinoshita M, Noda M, Copeland NG and Jenkins NA. (1994). *Genes Dev.,* **8,** 1613–1626.

Martins LM, Kottke T, Mesner PW, Basi GS, Sinha S, Frigon N, Tatar E, Tung JS, Bryant K, Takahashi A, Svingen PA, Madden BJ, McCormick DJ, Earnshaw WC and Kaufman SH. (1997). *J. Biol. Chem.,* **272,** 7421–7430.

McGahon A, Bissonnette R, Schmitt M, Cotter KM, Green DR and Cotter TG. (1994). *Blood,* **83,** 1179–1187.

Meisenholder GW, Martin SJ, Green DR, Nordberg J, Babior BM and Gottlieb RA. (1996). *J. Biol. Chem.,* **271,** 16260–16262.

Metzstein MM, Hengartner MO, Tsung N, Ellis RE and Hortvitz HR. (1996). *Nature,* **382,** 545–547.

Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. (1988). *Nucleic Acids Res.,* **16,** 1215.

Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwieg EA and Yuan J. (1993). *Cell,* **75,** 653–660.

Monney L, Otter I, Olivier R, Ravn U, Mirzasaleh H, Fellay I, Poirier GG and Borner C. (1996). *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **221,** 340–345.

Munday NA, Vaillancourt JP, Ali A, Casanos J, Miller DK, Molineaux SM, Yamin T, Yu VL and Nicholson DW. (1995). *J. Biol. Chem.,* **270,** 15870–15876.

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin T, Yu VL and Miller DK. (1995). *Nature,* **376,** 37–43.

Orth K, O'Rourke K, Salvesen GS and Dixit VM. (1996). *J. Biol. Chem.,* **271,** 20977–20980.

Pommier Y, Leteurtre F, Fesen M, Fujimori A, Bertrand R, Solary E, Kohlhagen G and Kohn KW. (1994). *Cancer Invest.*, **12,** 530–542.

Pommier Y. (1997). *Cancer Therapeutics: Experimental and Clinical Agents*. Teicher BA (ed). B. Teicher Humana Press Inc.: Towata, NJ. pp.153–174.

Renvoizé C, Roger R, Moulian N, Bertoglio J and Bréard J. (1997). *J. Immunol.*, in press.

Schlegel J, Peters I, Orrenius S, Miller DK, Thornberry NA, Yamin T and Nicholson DW. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271,** 1841–1844.

Shaham S and Horvitz HR. (1996). *Cell,* **86,** 201–208.

Slee EA, Zhu H, Chow SC, MacFarlane M, Nicholson DW and Cohen GM. (1996). *Biochem. J.*, **315,** 21–24.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC. (1985). *Ann. Biochem.*, **150,** 76–85.

Solary E, Bertrand R, Kohn K and Pommier Y. (1993). *Blood,* **81,** 1359–1367.

Solary E, Bertrand R and Pommier Y. (1994). *Leuk. & Lymph.*, **15,** 21–32.

Srivastava KK, Cable EE and Bonkovsky HL. (1993). *Biotechniques,* **15,** 226–227.

Takahashi A and Earnshaw WC. (1996). *Curr. Opinion Gen. Develop.*, **6,** 50–55.

Tewari M, Quan LT and O'Rourke K. (1995). *Cell,* **91,** 801–809.

Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H and Yuan J. (1994). *Cell,* **78,** 739–750.

Wu DD, Wallen HD and Nunez G. (1997). *Science,* **275,** 1126–1129.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM and Horvitz HR. (1993). *Cell,* **75,** 641–652.

2.2 - Effet de la surexpression de Bcl-2 sur l'expression des messagers *CASP* dans d'autres lignées.

Au cours de notre étude, nous avions observé que l'expression des ARNm *CASP* augmentait aussi dans les cellules HL-60 exposées à l'étoposide (Article 1, figure 4). Afin de vérifier l'effet de Bcl-2 observé dans les cellules U937, nous avons étudié l'expression des ARNm *CASP-2* dans les cellules HL-60 transfectées de manière stable avec l'oncogène bcl-2 en utilisant un couple d'amorces communes aux deux isoformes *CASP-2S* et *CASP-2L*. Nous avons observé :

1 - Que le niveau basal des messagers *CASP-2* était plus élevé dans les cellules exprimant Bcl-2 que dans les cellules transfectées avec le vecteur vide.

2 - Que l'expression de Bcl-2 avait le même effet dans HL-60 que dans U937 en prévenant l'accumulation transcriptionnelle des ARNm des gènes *CASP-2* (Figure 20A) (Article 1: figures 3 et 6, pour comparaison).

3 - Que les ARNm *CASP-2* ne sont plus détectables dans les cellules HL-60 témoins après 24 heures de traitement continu par 50 µM d'étoposide alors qu'ils restent détectables dans les cellules HL-60 surexprimant Bcl-2 (Figure 20A).

Des résultats similaires ont été obtenus en comparant des populations de cellules leucémiques K562 surexprimant ou non la protéine Bcl-2 et traitées par 100 µM d'étoposide (Figure 20B).

Ces résultats suggèrent que l'oncoprotéine Bcl-2, tout en protégeant de l'apoptose chimio-induite, augmente l'expression basale des ARNm des gènes *CASP*, inhibe la régulation positive induite par l'étoposide et prolonge l'expression de ces messagers, ce dernier effet étant probablement une conséquence non spécifique de son effet anti-apoptotique.

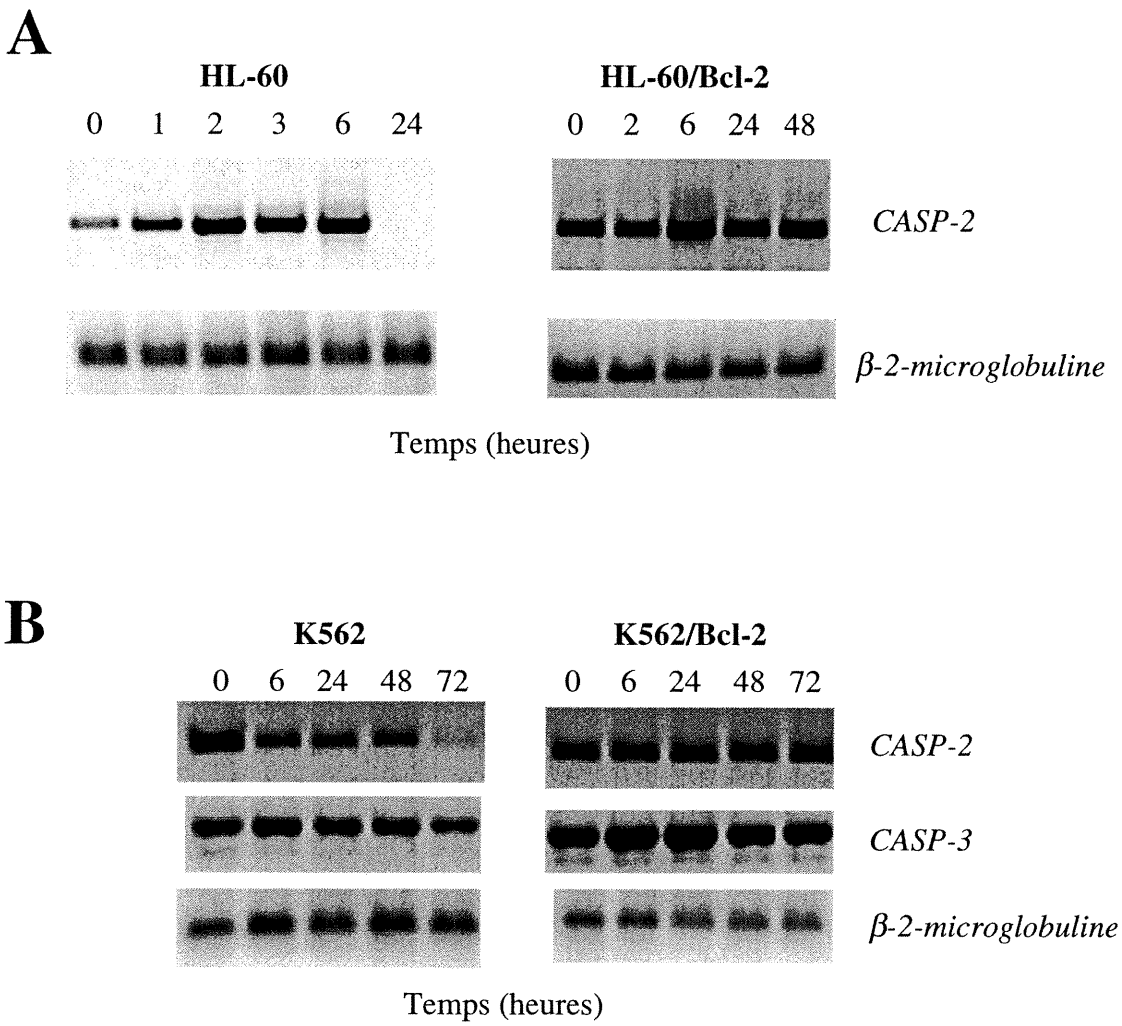


Figure 20: Etude de la surexpression de Bcl-2 sur l'expression des messagers *CASP* au cours d'un traitement par l'étoposide. L'expression de différents messagers *CASP* a été étudiée par RT-PCR dans différentes lignées transfectées ou non par l'oncogène Bcl-2. A) Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification *CASP-2* colorés au bromure d'éthidium dans les lignées HL60 et HL60/Bcl-2. La *β-2-microglobuline* est utilisée comme un contrôle interne. B) Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification *CASP-2* et *CASP-3* colorés au bromure d'éthidium dans les lignées K562 et K562/Bcl-2. La *β-2-microglobuline* est utilisée comme un contrôle interne.

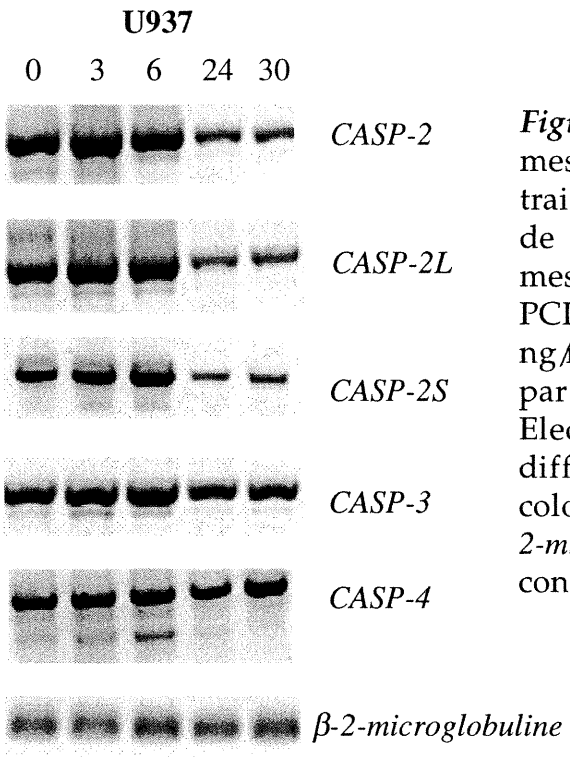


Figure 21: Etude de l'expression des messagers *CASP* au cours d'un traitement par un anticorps agoniste de Fas. L'expression de différents messagers *CASP* a été étudiée par RT-PCR dans la lignée U937 traitée par 50 ng/ml d'anticorps CH11 potentialisé par 0.8 µg/ml de cycloheximide. Electrophorèse sur gel d'agarose des différents produits d'amplification colorés au bromure d'éthidium. La *β-2-microglobuline* est utilisée comme un contrôle interne.

2.3- La voie apoptotique dépendant de Fas n'induit pas une augmentation des messagers *CASP*.

Nous avons vérifié si un traitement par un anticorps agoniste de Fas avait les mêmes conséquence sur l'expression des ARNm *CASP*. Dans la lignée U937 traitée en continu par 50 ng/ml d'anticorps CH11 potentialisé par 0.8 µg/ml de cycloheximide, aucune augmentation des messagers *CASP-2L*, *CASP-2S*, *CASP-3* et *CASP-4* a été observée au cours dutraitement (Figure 21).L'expression de ces différents messagers décroît au fur et à mesure que le pourcentage des cellules apoptotiques augmente. Ces résultats nous permettent de conclure que, contrairement à l'apoptose induite par l'étoposide, la voie apoptotique dépendant de Fas n'induit pas une accumulation transcriptionnelle des ARNm des gènes *CASP*.

CHAPITRE 3 Rôle de la procaspase-2L dans l'apoptose induite par Fas dans les cellules leucémiques humaines.

3.1 - Choix de l'agent inducteur.

L'influence de l'étoposide sur l'expression des ARNm *CASP-2L* et *CASP-2S* nous a conduit à nous intéresser plus spécifiquement à cette caspase. Deux isoformes connues pour avoir des effets opposés sur l'apoptose avaient été décrites (Wang *et coll.*, 1994) : une isoforme longue, la procaspase-2L, qui est un puissant inducteur d'apoptose, et une isoforme courte, la procaspase-2S, qui prévient l'apoptose induite par privation de sérum dans les cellules Rat-1 (Wang *et coll.*, 1994). Le rôle de ces deux isoformes dans l'apoptose induite par divers stimuli restait néanmoins mal compris.

Nous nous sommes d'abord intéressés au rôle de la procaspase-2L. L'utilisation d'une stratégie antisens avait montré l'implication de cette isoforme dans l'apoptose induite par privation de sérum et par l'interleukine-3 (Kumar *et coll.*, 1995). Nous avons cloné l'ADNc de *CASP-2L* en orientation antisens dans le vecteur d'expression eucaryote pTarget. Nous avons transfecté la lignée leucémique humaine U937 avec cette construction et sélectionné un clone dénommé U937/AS3 sous-exprimant la procaspase-2L (Figure 22A).

En utilisant un test d'élution sur filtre pour quantifier l'apoptose induite par l'étoposide, nous n'avons observé aucune différence significative entre la lignée U937/neo (transfectée par le vecteur vide) et la lignée U937/AS3 (Figure 22B). Ceci est du au fait que, si la lignée U937/AS3 sous-exprime bien la procaspase-2L à l'état basal, le traitement par l'étoposide induit rapidement une accumulation de la protéine, supprimant l'effet de la construction antisens (Figure 22C). Puisque la voie apoptotique dépendant de Fas n'induit pas d'augmentation de l'expression des ARNm *CASP* et des protéines correspondantes (Figure 22D), nous avons décidé d'étudier le rôle de la procaspase-2L dans l'apoptose induite par Fas.

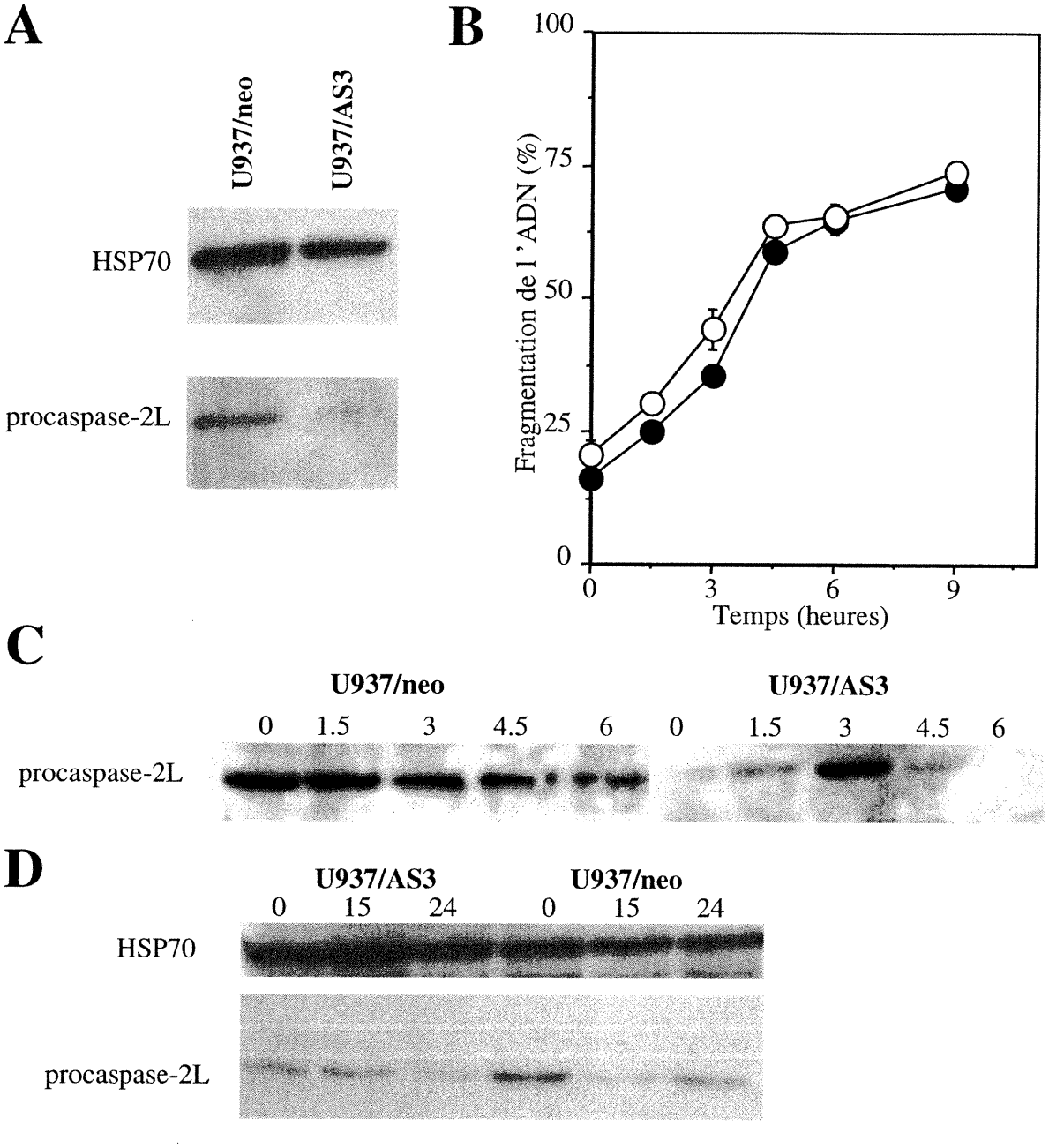


Figure 22: Caractérisation du clone U937/AS3 sous-exprimant la procaspase-2L. Les cellules U937/neo et U937/AS3 ont été transfectées avec le vecteur pTarget vide ou contenant l'ADNc *CASP-2L* en orientation antisens. A) Western blot vérifiant la sous-expression de la procaspase-2L dans la lignée U937/AS1 par rapport à la lignée contrôle B) Pourcentage de fragmentation d'ADN mesuré par un test d'élution sur filtre dans les lignées U937/neo (●) et U937/AS3 (○) traitées en continu par 50 µM d'étoposide pendant les temps indiqués. C) Etude de l'expression de la procaspase-2L par western blot dans les lignées U937/neo et U937/AS traitées en continu par 50 µM d'étoposide pendant les temps indiqués. D) Etude de l'expression de la procaspase-2L par western blot dans les lignées U937/neo et U937/AS3 traitées en continu par 50 ng/ml d'anti CH11 + 0.8 µg/ml de cycloheximide pendant les temps indiqués.

3.2 - Involvement of caspase-2 long isoform in Fas-mediated cell death of human leukemic cells (En révision - Blood).

Nous avons d'abord vérifié que la transfection stable de l'ARNm *CASP-2L* en position antisens dans les cellules U937 n'avait aucune influence sur l'expression basale d'autres procaspases (-3, -7, -8 et -10) étudiée par western blot.

Nous avons alors testé l'influence de cette transfection sur l'apoptose induite par un anticorps agoniste de Fas, le clone CH11, en présence de concentrations non toxiques de cycloheximide. L'apoptose a été détectée en quantifiant la fragmentation de l'ADN par un test sur filtre, en observant la condensation de la chromatine après coloration par le Hoechst 33342 et en détectant l'externalisation des phosphatidylsérines en cytométrie en flux. La réduction de l'expression de la procaspase-2L diminue la sensibilité des cellules U937 à l'apoptose induite par l'anticorps agoniste anti-Fas.

Nous avons cherché à comprendre à quel niveau se situait la procaspase-2L dans la cascade d'évènements moléculaires conduisant à la mort cellulaire dans les cellules U937 exposées à l'anticorps anti-Fas. Des travaux antérieurs de notre équipe ayant montré le rôle de la caspase-3 dans l'apoptose des cellules U937 induite par l'engagement de Fas (Dubrez *et coll.*, 1996; Eymin B. *et coll.*, 1999a), nous avons étudié l'influence de la sous-expression de la procaspase-2L sur l'activation de la procaspase-3 dans ce modèle. Après 15 heures de traitement par 50 ng/ml d'anticorps CH11 en présence de 0.8 µg/ml de cycloheximide, la procaspase-3 est clivée en ses fragments actifs p19 et p17 et une activité DEVDase est détectée dans les cellules contrôles alors que ces deux évènements sont inhibés dans la lignée sous-exprimant la procaspase-2L, suggérant que la procaspase-2L intervenait en amont de la caspase-3 dans ce modèle.

Nous nous sommes alors demandés si la procaspase-2L agissait en

amont ou en aval des évènements mitochondriaux. Nous avons observé que, dans les cellules, l'engagement de Fas induisait l'apoptose en s'aidant de la mitochondrie puisque ce stimulus provoquait le relargage du cytochrome c de l'espace membranaire intermitochondrial dans le cytosol. La sous-expression de la procaspase-2L bloque ce relargage du cytochrome c. Le clivage de la protéine Bid, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2, ayant été impliqué dans l'activation des évènements mitochondriaux lors de l'apoptose médiée par Fas (Luo *et coll.*, 1998; Li *et coll.*, 1998), nous avons étudié l'expression de cette protéine. La diminution de l'expression de la forme mature de Bid, suggérant son clivage, a été observé dans les cellules contrôles. Cet évènement est prévenu par la diminution de l'expression de la procaspase-2L, suggérant que cette caspase agit en amont de cet évènement.

La caspase-8, responsable du clivage de Bid (Luo *et coll.*, 1998; Li *et coll.*, 1998), est recrutée sous forme de procaspase au niveau du DISC lors de l'engagement de Fas (Medema *et coll.*, 1998). La sous-expression de la procaspase-2L retarde l'activation de la procaspase-8 au cours de l'apoptose induite par un anticorps agoniste de Fas. En effet, après 16 heures de traitement par 50 ng/ml d'anticorps CH11 potentialisé par 0.8 µg/ml de cycloheximide, alors qu'une diminution de la procaspase-8 et qu'une activité caspase-8 sont identifiés dans les cellules contrôles, aucune diminution de la proforme ni activité ne sont observées dans la lignée sous-exprimant la procaspase-2L. Ces résultats suggèrent que l'isoforme longue de la caspase-2 contribue à l'activation de la caspase-8 au niveau du DISC dans la voie Fas.

Ces observations ne sont pas spécifiques de la lignée leucémique humaine U937. Un effet similaire a été détecté dans les cellules leucémiques humaines Jurkat et CEM transfectées avec le vecteur pTarget-*CASP-2L* antisens. De plus, l'inhibiteur spécifique de la caspase-2 zVDVAD-fmk inhibe l'apoptose dépendant de Fas dans les lignées U937 et Jurkat.

Des expériences d'immunoprécipitation nous ont permis de montrer, après co-transfection, que la procaspase-2L n'interagit ni avec FADD, ni avec la procaspase-8. La sous-expression de la procaspase-2L n'interfére pas avec la formation du DISC dans les lignées Jurkat et U937. Par contre, la sous-expression de la procaspase-2L retarde le clivage de c-FLIP (Hu *et coll.*, 1997; Irmler *et coll.*, 1997), un inhibiteur directe de la procaspase-8.

Enfin, cet effet de la procaspase-2L n'est pas spécifique de la voie Fas. Un effet similaire a été observé sur la réponse des cellules U937 à la cytokine TRAIL, suggérant que la caspase-2L pourrait amplifier la réponse à divers agonistes des récepteurs à domaine de mort.

Involvement of caspase-2 long isoform in Fas-mediated cell death of human leukemic cells.

Caspase-2 in Fas-mediated apoptosis

Nathalie Droin[1,2], Florence Bichat[1], Cedric Rébé[1], Anne Wotawa[1], Olivier Sordet[1], Arlette Hammann[1], Richard Bertrand[2], Eric Solary[1].

INSERM U517, Faculties of Medicine & Pharmacy, BP87900, 21079 Dijon, France [1] and Research Centre of University of Montreal Hospital Centre, Notre Dame Hospital, 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec H2L 4M1 Canada [2].

Research grant support : This work was supported by grants from the committees (Côte d'Or, Nièvre, Saône et Loire) of the Ligue Nationale Contre le Cancer, the Association pour la Recherche contre le Cancer (# 9567) and the Conseil Régional de Bourgogne to ES and from the Medical Research Council of Canada (MT-15019) to RB. ND obtained a studentship from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie (France) and from the Société Française d'Hématologie. RB is a scholar from the Medical Research Council of Canada and the Cancer Research Society Inc (Canada).

Florence Bichat et Cedric Rébé ont participé au projet en réalisant certains western blots et en vérifiant des mesures d'activité caspase.
Olivier Sordet et Anne Wotawa ont verifié certains résultats dans les lignées U937 / neo et U937 / AS3.
Arlette Hammann a analysé l'annexine V au FACS.

ABSTRACT

Engagement of the plasma membrane receptor Fas can induce apoptosis of leukemic cells. Signaling through Fas requires the formation of a death-inducing signaling complex (DISC) that involves the cytoplasmic domain of Fas, the adaptor molecule FADD/MORT-1 and procaspase-8. The present study investigated whether another caspase, known as procaspase-2L, played a role in Fas-mediated cell death. We derived a series of human leukemic variant cells by stable transfection with a *CASP2L* antisense construct (*CASP2L/AS*). Specific down-regulation of procaspase-2L decreased the sensitivity of these cells to apoptosis induced by an agonistic anti-Fas antibody (Ab, clone CH11), as determined by studying DNA fragmentation, chromatin condensation and externalization of phosphatidylserine on the plasma membrane. In leukemic cells transfected with an empty vector, anti-Fas Ab treatment activated caspase-8, decreased the expression of the BH3-domain only protein Bid, triggered the release of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol and activated caspase-3. All these events could not be observed when *CASP2L/AS* cells were similarly treated with anti-Fas Abs. *CASP2L/AS* transfection did not inhibit the formation of the DISC and no direct interaction between procaspase-2L and either Fas or FADD or procaspase-8 was identified. Down-regulation of procaspase-2L inhibited anti-Fas Ab-mediated cleavage of c-FLIP (FLICE-inhibitory protein), a protein that interferes with the formation of a functional DISC. These results suggest that the long isoform of caspase-2 plays a role in the Fas-mediated pathway to cell death by contributing to caspase-8 activation at the DISC level.

INTRODUCTION

Apoptosis can be induced in many cell types by engagement of the Fas (CD95/APO-1) receptor by its natural ligand (FasL) or agonistic Abs (anti-Fas Ab)[1,2]. Fas-mediated cell death was proposed to play a role in T-cell[3] and erythroid cell[4] homeostasis. Fas receptor was also suggested to be involved in the early phase of cytotoxic drug-mediated leukemic cell apoptosis[5,6]. Signaling through Fas requires its aggregation and the formation of an intracellular protein complex referred to as the death-inducing signaling complex (DISC)[7,8]. This complex consists of the cytoplasmic domain of Fas, the adaptor molecule FADD/MORT-1 and the cysteine aspartic acid specific-protease Mch5/Flice/Mach/procaspase-8[9-13]. This latter protein belongs to a family of structurally related cysteine proteases that currently includes 14 enzymes in mammals[14]. All are synthesized as inactive proenzymes that have to be cleaved at key aspartate residues to be activated[15]. Caspases can be divided into two groups according to the length of their prodomain, those with a short prodomain (procaspase-3, -6 and -7) and those with a long prodomain (the remainder). These enzymes were shown to function as a proteolytic cascade in which caspases with a long prodomain act upstream of those with a short prodomain[16]. In the Fas-mediated cell death pathway, caspase-3 was suggested to play an important role in the cascade, downstream of caspase-8[17].

The binding of procaspase-8 to FADD/MORT-1 is mediated through tandem death effector domains (DED). The FLICE-inhibitory protein, c-FLIP (Casper/I-Flice/Flame-1/Cash/Clarp/Mrit/Usurpin) that contains similar DED but an inactive caspase domain, interferes with the formation of a functional DISC[18-25]. Upon recruitment to the DISC, procaspase-8 is processed into its active subunits which are released from the complex to cleave intracellular substrates and to signal apoptosis[26]. The amount of active caspase-8 generated at the DISC and the level of expression of procaspase-3 could determine whether downstream pathways involve the mitochondria or not[27]. Type I cells in which caspase-8 directly activates downstream caspases to induce the cell demise were distinguished from type II cells in which caspases have to cleave the pro-apoptotic BH3-domain only protein of

the Bcl-2 family known as Bid to trigger cell death[28,29]. In this latter pathway, cleaved/activated Bid migrates from the cytosol to the mitochondria and induces the opening of the permeability transition pores, the loss of inner mitochondrial transmembrane potential and the release of apoptogenic factors such as cytochrome c and Apoptosis inducing factor (AIF)[30-33]. In the cytosol, cytochrome c triggers oligomerization of the adaptor molecule APAF-1 in the presence of ATP. Oligomerized APAF-1 recruits and activates caspase-9 that, in turn, activates caspase-3 and other downstream caspases in a proteolytic cascade[34-36].

The specific contribution of other caspases to Fas-mediated cell death remains poorly understood. One of these is caspase-2, initially described as Nedd2/Ich1, whose gene was highly expressed in mouse embryonic brain and down-regulated in adult[37,38]. Caspase-2-deficient mice have shown that this enzyme acts both as a positive and a negative regulator of cell death[39]. Alternative splicing of the *CASP2* gene[37] generates at least two messengers that encode a long isoform, caspase-2L, whose overexpression induces cell death, and a short isoform, caspase-2S, that antagonizes cell death. Caspase-2L is the dominant isoform that is expressed in most tissues. Its contribution to apoptosis is attested by several lines of evidence. Procaspase-2L can be activated by cleavage early in the process of apoptosis, its overexpression induces mammalian cell death, antisense-mediated decrease of procaspase-2L expression delays cell death induced by trophic factor deprivation in various cell lines and oocytes from caspase-2-deficient mice are resistant to chemotherapeutic drug-induced apoptosis[39-42]. The prodomain of procaspase-2 interacts with the TNFR1 receptor via the adaptor molecules TRADD, RIP and RAIDD/ CRADD, suggesting its upstream involvement in the proteolytic cascade that mediates TNFα-induced cell death[43,44]. Procaspase-2 has also been shown to be a target of caspase-3, suggesting its downstream involvement in the caspase cascade activated by other stimuli[45].

To analyze the role of caspase-2L in Fas-mediated apoptosis, we have derived a series of variant human leukemic cell populations by transfection with a *CASP2L* antisense construct (*CASP2L/AS*). Our results indicate that the presence of caspase-2L contributes to caspase-8 activation and

downstream events, including Bid cleavage, cytochrome c release, caspase-3 activation and DNA fragmentation in leukemic cells exposed to anti-Fas Abs. Furthermore, c-FLIP cleavage was prevented by down-regulation of caspase-2L, suggesting a potential mechanism for caspase-2-mediated sensitization to Fas agonists.

METHODS

Chemicals and reagents. The anti-human Fas monoclonal Abs (IgM, clone CH-11) were obtained from Biovalley Medical and Biological Laboratories (Conches, France) whereas the recombinant soluble FasL was collected from the supernatant of FasL-transfected Neuro2A cells (a kind gift of Dr Fontana, Lausanne, Switzerland). Soluble human TRAIL (Alexis Biochemicals, San Diego, CA; 100 to 200 ng/ml) was crosslinked with 2 µg/ml of enhancer. [2-^{14}C]-thymidine (59 mCi/mmol) was obtained from Amersham (Les Ulis, France). Geneticin (G418), Hoechst 33342 and cycloheximide (CHX) were obtained from Sigma Chemical Co (St-Quentin-Fallavier, France). The fluorogenic peptide derivatives Ac-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) and benzyloxy-carbonyl-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin (Z-IETD-AFC) as well as the caspase-2 inhibitor benzyloxy-carbonyl-Val-Asp(OMe)-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone (Z-VDVAD-fmk) were bought from Calbiochem (Meudon, France). All other chemicals were of reagent grade and purchased from Sigma, ICN Pharmaceuticals (Orsay, France) or other local sources.

Cell line and culture conditions. The U937, Jurkat and CEM human leukemic cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and grown in suspension culture at 37°C in the presence of 5% CO_2 in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactived fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cell culture products were purchased from Biowhittaker (Fontenay-sous-bois, France). To ensure an exponential

growth, cells were resuspended in fresh medium 24 h before each treatment. Cell viability was checked at regular intervals of time by using a trypan blue exclusion assay.

cDNA construct and cell transfection. *CASP2L* cDNA was generated by RT-PCR performed on RNA extracted from U937 cells[46], and subcloned in an antisense orientation (*CASP2L*/AS) into pTARGET vector (Promega, Charbonnières, France). About 1.0 x 10^7 cells were electroporated at 270 kVolts with 10 µg of pTARGET-*CASP2L/AS* or empty vector. The cells were cultured for 3 weeks in medium containing 1.0 mg/ml G418 to generate mixed cell populations. In addition, 48 h after electroporation, some transfected cells were plated in 96-well plates at different cell densities and cultured during 4 weeks in medium containing 1.0 mg/ml G418. Clones were selected for subsequent analyses and maintained in 1.0 mg/ml G418 containing medium.

Antibodies. Monoclonal Abs used in this study include anti-human procaspase-3 (clone 19) porcaspase-7 (clone 51) and FADD (clone 1) purchased from Transduction Laboratories (Lexington, KY), anti-human procaspase-2 (clone G310-1248), procaspase-8 (clone B9-2) and cytochrome c (clone 7H8.2C12) obtained from Pharmingen (San Diego, CA) and anti-human procaspase-8 from Biosource International (Camarillo, CA). Affinity purified polyclonal Abs used include anti-human caspase-2 and anti-human HSC-70 from Santa Cruz (CA), anti-human Bid from R&D System (Oxon, UK), anti-human PARP from Boerhinger Mannheim (Meyla, France), anti-human caspase-10 and anti-human c-FLIP from Pharmingen and another anti-human c-FLIP from Upstate Biotechnology (Souffelweyersheim, France). The rabbit polyclonal anti-caspase-3 serum which recognizes the proenzyme (p32) and its p19 and p17 subunits, was kindly provided by Dr D. Nicholson (Merck, Toronto, Canada). Goat horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit Abs were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PE). Enhanced chemiluminescence reagents (ECL) were from Amersham.

Western blot, co-immunoprecipitation and fractionation analysis. For Western blot analysis, cells were washed twice in ice-cold PBS, lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% Na-SDS, 0.5% Na-desoxycholate) in the presence of protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 2.5 µg/ml pepstatin, 10 µg/ml aprotinin, 2.5 µg/ml trypsin inhibitor, 5 µg/ml leupeptin) for 30 min on ice, then centrifuged at 15 000 X g for 20 min at 4°C. Supernatants were collected and 50 µg proteins were incubated in loading buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% ß-mercaptoethanol, 4.6% SDS, 20% glycerol and 0.003% bromophenol blue) prior to SDS-PAGE on a 12-15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel. Following electrophoresis, proteins were electroblotted to PVDF. After blocking non-specific binding sites overnight with 5% nonfat milk in TPBS (PBS, 0.1% Tween 20), membranes were incubated for 2-3 h at RT with the primary Abs. After two washes in TPBS, membranes were incubated with the corresponding peroxidase-conjugated secondary Abs for 30 min at RT. Immunoblots were revealed by ECL and autoradiography. For co-immunoprecipitation studies, cells were collected by centrifugation, washed twice with ice-cold PBS, and then homogenized in a lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM $NaVO_4$; 1% BSA; 1% NP-40; 2 mM PMSF; 1.0 mg/ml aprotinin) at 4°C for 30 min. The extracts were then centrifuged and supernatants were collected. The anti-human caspase-8 (Medicorp), caspase-2 (Santa Cruz) and Fas (clone APO1-3, Alexis Biochemicals) were added overnight, which was followed by incubation with protein A/G Agarose for 1 h and centrifugation. Immunoprecipitates were washed in lysis buffer without NP-40 and analyzed by Western blotting. For subcellular fractionation, cells were resuspended in ice-cold buffer A (250 mM sucrose, 20 mM HEPES pH 7.4, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DDT, 17 µg/ml PMSF, 8 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupeptine) and dounced briefly on ice. Unlysed cells and nuclei (750 X g for 10 min) and mitochondria (10 000 X g for 25 min) were pelleted by sequential differential centrifugation. Supernatants were further clarified by centrifugation at 100 000 X g for 60 min (S100 fraction).

Immunocytofluorometry and confocal microscopy analysis. Relative level of expression of Fas in control and transfected variant lines was determined by cytofluorometry and confocal microscopy analysis. Non-permeable cells were incubated in the absence and presence of anti-human Fas (clone DX2 from Pharmingen) as previously described[5] and the fluorescence intensity distribution was studied by using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Cells were also fixed for confocal microscopy analysis as previously described[47].

Identification of apoptosis. Staining of nuclear chromatin with Hoechst 33342 for 30 min at 37°C was used for identification of morphological changes by fluorescence microscopy (each percentage was established by counting 400 cells). DNA fragmentation was measured by using a previously described DNA filter elution assay[48] and expressed as percentage of fragmented relative to total DNA. Exposure of phosphatidylserine on the outer plasma membrane leaflet was identified by Annexin V-FITC staining in the presence of propidium iodide (Boehringer Ingelheim, Heidelberg, Germany). Briefly, cells were resuspended in 10 mM HEPES, pH7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$, in the presence of annexin V-FITC (1.0 mg/ml) and propidium iodide (1.0 mg/ml) for 10 min in the dark and analyzed by using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson).

Caspase activity. Cytosolic extracts were prepared by resuspending the cells at indicated times in a lysis buffer containing 100 mM HEPES (pH7.5), 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 20% glycerol and 0.3% NP-40. Samples were centrifuged at 10,000 X g for 15 min at 4°C and supernatants were collected as cytosolic extracts. Caspase activities were measured as described[17] by monitoring fluorescence continuously in a dual luminescence fluorimeter (LS 50B Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) using specific excitation and emission wavelengths for Ac-DEVD-AMC and z-IETD-AFC peptide derivative substrates, respectively. Reactions were carried out at 37°C using a water-jacketed sample compartment. The assay mixture contained 100 mM HEPES (pH7.5), 20% glycerol, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 200 µM fluorogenic peptides

and 200 µg proteins per assay. Enzyme activities were determined as initial velocities (intensity/min/mg) and related to results obtained in untreated cells.

RESULTS

Stable transfection of *CASP2L* /AS in U937 human leukemic cells. To evaluate the contribution of caspase-2L to Fas-mediated cell death, the full-length *CASP2L* cDNA was subcloned into an antisense orientation in pTARGET plasmid vector that contains a neomycin-resistance gene. U937 cells were stably transfected by electroporation with the *NEO* or *CASP2L/AS* vectors and stable clones and mixed populations were derived under G418 selection. Western blot analysis of transfected cells using an anti-human caspase-2 Ab revealed the presence of a 48 kDa protein in cells transfected with the empty vector (Figure 1A; U937/neo). The expression of the 48 kDa long isoform of procaspase-2 was decreased in the two mixed cell populations (Figure 1A; U937/AS1 and U937/AS2) as well as in a selected clone (Figure 1B; U937/AS3). The antisense constructs did not significantly modify the level of expression of Fas, FADD and various procaspases including procaspase-3, -7 and -8 (Figure 1B). The lack of influence of *CASP2L/AS* construct on the plasma membrane expression of Fas was demonstrated by flow cytometry (Figure 1C). Confocal microscopy analysis showed that the clustering of Fas upon stimulation with recombinant soluble Fas-L was similar in U937/neo and U937/AS3 cells (Figure 1D).

Decreased expression of procaspase-2L delays anti-Fas Ab-induced apoptosis in U937 cells. To determine the role of procaspase-2L in cell response to Fas agonists, we have exposed U937/neo and U937/AS3 clones to 50 ng/ml anti-Fas (clone CH11) Ab in the presence of 0.8 µg/ml CHX. In the tested conditions, neither anti-Fas Abs nor CHX were toxic to the cells[49]. The occurrence of DNA fragmentation, monitored by a DNA filter elution assay, was delayed in U937/AS3 compared to U937/neo, with approximately 25% and 50% of fragmented DNA 15 h after treatment, respectively (Figure 2A).

Trypan blue exclusion assays indicated that in most cells, plasma membranes were able to exclude the dye, even 24 h after treatment, suggesting that the observed DNA fragmentation was related to apoptosis rather than necrosis (not shown). Apoptotic cell death was further demonstrated by Hoechst 33342 staining of nuclear chromatin in anti-Fas-Ab-treated cells (Figure 2B). The morphological study confirmed that anti-Fas Ab-induced cell death was delayed in U937/AS3 compared to U937/neo cells. Externalization of phosphatidylserine on the outer leaflet of the plasma membrane is an early event in cells that are induced to undergo apoptosis[50]. Using FITC-labeled Annexin V and flow cytometry analysis, we observed that the appearance of Annexin V positive cells was also delayed in U937/AS3 compared to U937/neo cells after anti-Fas Ab treatment (Figure 2C). In parallel, U937/neo and U937/AS3 cells remained unlabeled by propidium iodide, further indicating that the plasma membrane was not disrupted (Figure 2C). Similar modulation in kinetics of apoptosis induction was observed in U937/AS1 and U937/AS2 cells (data not shown). Altogether, these results indicated that decreased expression of procaspase-2L in U937 cells delayed anti-Fas Ab-induced apoptosis.

Decreased expression of procaspase-2L prevents procaspase-3 activation and cytochrome c release in anti-Fas Ab treated U937 cells. We have shown previously that Fas-induced cell death was associated with procaspase-3 cleavage / activation in U937 cells[51]. Using a rabbit polyclonal Ab raised against the long subunit of caspase-3, we observed that procaspase-3 was rapidly cleaved into a p19 and a p17 fragments in Fas-treated U937/neo cells. This cleavage, that suggested caspase-3 activation, was not observed in U937/AS3 cells (Figure 3A). The cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase, a well-known target for active caspase-3, was also delayed in U937/AS3 compared to U937/neo cells (not shown). To confirm that decreased expression of procaspase-2L prevented caspase-3 activation, we measured the ability of lysates from untreated and anti-Fas Ab-treated U937/neo and U937/AS3 cells to cleave the DEVD-AMC substrate that mimics the specific target site for some effector caspases, mainly caspase-3. This activity was

strongly increased in U937/neo cells exposed to anti-Fas Abs whereas it remained low in U937/AS3 clone (Figure 3B).

To delineate more precisely the pathway of caspase-3 activation during anti-Fas Ab treatment, cytochrome c release from the mitochondria to the cytosol was monitored. After a 6 hour exposure to anti-Fas Abs, the cytochrome c release observed in U937/neo cells was not identified in U937/AS3 cells treated in similar conditions (Figure 3C). In addition, the time-dependent decrease of Bid expression observed in U937/neo cells was delayed in U937/AS3 cells (Figure 3D). Altogether, these results suggested that caspase-2L might interfere with Fas-mediated apoptosis pathway upstream of the mitochondrial release of pro-apoptotic molecules and Bid cleavage.

Decreased expression of procaspase-2L inhibits anti-Fas Ab-mediated caspase-8 activation. Since caspase-8 activation has been shown to play a central role in Fas-mediated cell death[9-13,52], we monitored procaspase-8 expression and caspase-8 activaty in U937/neo and U937/AS3 cells exposed to anti-Fas Abs. The decrease of procaspase-8 expression, suggesting its cleavage into active fragments, was observed to be almost inhibited in U937/AS3 compared to U397/neo cells (Figure 4A). As a control, procaspase-10 expression remained unchanged in anti-Fas Ab-treated U937/neo and U937/AS3 cells (Figure 4A). The hypothesis that down-regulation of caspase-2L expression could prevent caspase-8 activation in response to Fas agonists was confirmed by measuring IETDase activity in U937/neo and U937/AS cells following exposure to anti-Fas Abs. IETDase activity demonstrated a biphasic kinetics in U397/neo cells that was not observed in U937/AS3 cells (Figure 4B).

Stable transfection of *CASP2L/AS* also interferes with Fas-mediated cell death in Jurkat and CEM leukemic cell lines. The previous experiments were repeated in mixed cell populations obtained by stably transfecting two other human leukemic cell lines with either the empty vector (Jurkat/neo and CEM/neo) or the *CASP2L/AS* containing vector (Jurkat/AS1,

Jurkat/AS2 and CEM/AS). Western blot analysis demonstrated that procaspase-2L expression was decreased in Jurkat and CEM cell populations transfected with the antisense construct (Figure 5A). When exposed to CH11 anti-Fas Abs, Jurkat/neo and CEM/neo cells underwent apoptosis, as demonstrated by Hoechst 33342 staining of nuclear chromatin (Figure 5B and 5C). On the contrary to U937 cells, CHX was not required for CH11 Abs to induce apoptosis in Jurkat and CEM cells. Dose response and time course experiments confirmed the results obtained in *CASP2L/AS*-transfected U937 cells by showing that decreased expression of procaspase-2L in Jurkat/AS and CEM/AS cells significantly delayed Fas-mediated apoptosis (Figure 5B and 5C). In addition, by using DEVD-AMC and IETD-AFC as substrates to measure caspase activities, we observed that activation of these enzymes was delayed in cells transfected with the antisense construct (Figure 6A). This was in accordance with western blot analyses showing that the decreased expression of procaspase-3, procaspase-8 and Bid as well as the cleavage of the 116 kDa PARP into a 85 kDa fragment, observed in Jurkat/neo cells exposed to anti-Fas Abs, was delayed in two Jurkat/AS mixed populations treated in similar conditions (Figure 6B). The same observations were made by comparing CEM/neo and CEM/AS cells (data not shown).

The caspase-2 inhibitor z-VDVAD prevents Fas-induced apoptosis in U937 and Jurkat cells. When added to cell culture in combination with CH11 anti-Fas Abs, the permeant peptide inhibitor Z-VDVAD-fmk, designed to inhibit caspase-2[53,54], prevented apoptosis in both U937 and Jurkat parental cell lines (Figure 7A and 7B). This peptide also prevented activation of the proteases that cleave DEVD-AMC and IETD-AFC substrates (Figure 7C). These results further argued for a role of caspase-2 in Fas-mediated apoptosis.

Procaspase-2L does not interact with the DISC components. Results from the previous experiments had suggested that caspase-2L could facilitate procaspase-8 activation during Fas-induced apoptosis in U937 cells. To determine whether this effect was a consequence of a direct interaction of procaspase-2L with procaspase-8 or the adaptor protein FADD, we performed

immunoprecipitation experiments in control and anti-Fas Ab-treated U937/neo cells. Even by using high concentrations of Abs, no interaction was identified between procaspase-2L and either procaspase-8 or FADD (Figure 8A & 8B). As described previously [55], under these conditions of Ab excess, an interaction between procaspase-8 and FADD was detected in both untreated and anti-Fas-treated U937/neo cells (Figure 8B). To determine whether caspase-2L was required for the DISC formation, we realized immunoprecipitation experiments using an anti-Fas Ab in control and FasL-treated cells. This experiment, performed in Jurkat/neo and Jurkat/AS1 cell populations, demonstrated that transfection with *CASP2-L AS* did not prevent interaction of Fas with FADD and procaspase-8 in response to FasL. Recruitment of procaspase-8 was decreased while no interaction with procaspase-2L could be detected (Figure 9). Similar results were obtained by comparing U937/neo and U937/AS clones exposed to FasL in the presence of CHX (data not shown).

Decreased expression of procaspase-2L prevents the cleavage of c-FLIP. We also evaluated the effect of caspase-2L on c-FLIP (FLICE-inhibitory protein), a potent inhibitor of procaspase-8 activation at the DISC. Western blot experiments performed with a first polyclonal anti-c-FLIP Ab (Upstate Lab.) indicated that the decreased expression of c-FLIP observed in U937/neo cells treated with anti-Fas Abs was delayed in U937/AS3 cells (Figure 10A). By using another polyclonal anti-c-FLIP Ab (Pharmingen), we identified a 12 kDa cleavage fragment in U937/neo cells exposed to anti-Fas Abs. This cleavage fragment was not observed in U937/AS3 cells treated in the same conditions (Figure 10B). Similar results were obtained in U937/AS1 and AS2 cells (not shown).

CASP2-L AS transfection also delays TRAIL-mediated apoptosis. To determine whether caspase-2L could play a role in the apoptotic pathway triggered by engagement of another death receptor, we tested the influence of *CASP2L/AS* transfection on TRAIL-mediated apoptosis in Jurkat (TRAIL : 100 ng/ml) and CEM (TRAIL : 200 ng/ml) cells. In both cell lines, decreased

expression of procaspase-2L was associated with a delay in TRAIL-induced apoptosis, as determined by Hoechst 33342 staining of nuclear chromatin (Figure 11).

DISCUSSION

The present study suggests that the long isoform of caspase-2 plays a role in the Fas-mediated pathway to cell death by contributing to caspase-8 activation at the DISC level. The role of caspase-2 in cell death pathways appears to depend on both the apoptotic stimulus and the cell type. Analysis of caspase-2 -/- mice has implicated caspase-2 in apoptosis of oocytes triggered by the cytotoxic agent doxorubicin, whereas doxorubicin-induced cell death pathway remains efficient in B and T lymphoblasts from these caspase-2 knock-out animals[39]. On the other hand, B lymphoblasts from these mice were reported to be resistant to granzyme B-mediated apoptosis[39]. In the present study, we used an antisense construct to downregulate the expression of caspase-2L in the human leukemic cell line. Similar strategy has been previously used to demonstrate caspase-2 involvement in FDC-P1 murine myeloid progenitor cell death triggered by GM-CSF and IL-3 deprivation[41]. A potential limit to this strategy is that antisense caspase-2 could cross-react and inhibit the expression of other related caspases. However, *CASP2L* cDNA shares a limited homology with other caspases including those of the caspase-1- or caspase-3-related groups[14,56]. In the present study, transfection of *CASP2L/AS* in leukemic cells resulted in decreased expression of caspase-2L, whereas no change could be detected in procaspase-3, -7, -8 and -10 protein levels. These observations suggested that *CASP2L/AS* might specifically down-regulate procaspase-2L expression. Interestingly, these cells did not demonstrate any significant resistance to etoposide-induced apoptotic DNA fragmentation (data not shown), possibly due to drug-induced transcriptional activation of *CASP-2* gene that would overcome the antisense effect after etoposide treatment[46]. By contrast, anti-Fas Ab-mediated apoptosis, that is not associated with an increase transcriptional increase of *CASP-2* gene expression, was significantly delayed

in *CASP2L/AS* transfected cells. These results suggested a role for caspase-2L in Fas-mediated leukemic cell death.

The pathway leading to Fas-mediated apoptosis depends on the clustering of Fas receptor that triggers the death signal. Decreased expression of procaspase-2L did not influence Fas receptor expression on the plasma membrane of leukemic cells. When analyzed by confocal microscopy, the clustering of Fas receptor triggered by Fas-L on the plasma membrane of leukemic cells[47] was not influenced by procaspase-2L down-regulation. In these cells, Fas-mediated cell death involves the decreased expression of the native form of the BH3-domain-only protein Bid[28,29], the release of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol and the activation of caspase-3. Caspase-mediated cleavage of Bid[28,57] was proposed to mediate, either directly or through Bax dimerization, the mitochondrial damage observed in some cells exposed to Fas agonists[29,58]. Since caspase-2L downregulation was observed to delay all these events, the enzyme was supposed to interfere with Fas-mediated cell death pathway somewhere between Fas clustering at the plasma membrane and caspase-mediated cleavage of Bid[28,29].

Death signalization through Fas receptor involves the recruitment of FADD and procaspase-8 to form the DISC[8]. Recruitment of procaspase-8 to the DISC leads to its proteolytic activation[12,13]. Gene ablation studies in mice have shown that the presence of caspase-8 was an essential requirement for Fas-mediated cell death[52]. We observed that downregulation of procaspase-2L expression prevented Fas-mediated caspase-8 activation. One possible explanation for that observation was that procaspase-2L could be recruited to the DISC to facilitate caspase-8 activation upon Fas stimulation. Procaspase-2L had been shown to associate via its amino-terminal CARD domain with RAIDD, a death adaptor molecule that is involved in death signaling through the TNF-R1 complex via association with the death domain proteins RIP and TRADD[44]. Immunoprecipitation experiments failed to identify any direct interaction between procaspase-2L and either Fas or FADD or procaspase-8. These experiments also showed that decreased procaspase-2L expression did not prevent the formation of the DISC but could interfere with procaspase-8 recruitment. These observations suggest

that caspase-2L could indirectly modulate the kinetics of caspase-8 recruitment and activation in the DISC, e.g. through the cleavage products of a target protein. The mechanism of this modulation remains to be clarified.

Another molecule that interferes with the Fas-mediated cell death pathway is c-FLIP, a protein structurally-related to procaspase-8 but lacking a catalytic active site and the residues that form the substrate binding pocket[18-25]. The protein is predominantly found as a 55-kDa isoform in most tissues and cell lines[19], although a minor species of 27/28 kDa was also detected in some cell types[18,59]. In hematopoietic cells, mainly lymphoid cells, overexpression of c-FLIP could involve a cell surface-mediated signaling pathway through a member of the immunoglobulin gene superfamily named Toso[60]. The role of c-FLIP in controlling Fas susceptibility of peripheral T cells and other cell types remains controversial[59,61]. Overexpression of c-FLIP was proposed to specifically prevent death receptor-induced apoptosis through inhibition of procaspase-8 processing without affecting other pathways of cell death[18-21,59,62,63]. However, some reports have suggested that c-FLIP could behave as a pro-apoptotic molecule whose effect can be inhibited by a dominant-negative caspase-8 mutant, various caspase inhibitors and the anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family[22-25]. Another controversial issue concerns the consequences of the caspase-mediated cleavage of c-FLIP. Caspase-2 is one of the caspases that have been shown to cleave c-FLIP at Asp-341 to generate a p43 N-terminal and a p12 C-terminal fragments *in vitro*[21]. Some authors have proposed that the cleavage of c-FLIP was required for its anti-apoptotic activity[59] while others have reported that upregulation of the native molecule was essential for its activity[64,65]. In the present study, we show that the decreased expression of c-FLIP induced by anti-Fas Ab treatment of leukemic cells is prevented by procaspase-2L down-regulation. A faint cleavage fragment of c-FLIP can be identified in anti-Fas Ab-treated control cells whereas this fragment is not detected in anti-Fas Ab-treated *CASP2L/AS*-transfected cells. Though inhibition of c-FLIP cleavage could account for the decreased sensitivity of *CASP2L/AS*-transfected cells to Fas-mediated cell death, we cannot rule out the possibility that this inhibition is a non-specific

consequence of the decreased activation of caspase-8 and downstream caspases[21].

To summarize, decreased expression of procaspase-2L in human leukemic cell lines was observed to prevent the activation of procaspase-8 and downstream events induced by agonistic anti-Fas Abs, including decreased expression of Bid, cytochrome c release from the mitochondria, procaspase-3 activation, apoptotic DNA fragmentation and externalization of phosphotidylserine on the plasma membrane. These results strongly suggest that caspase-2L plays a role in caspase-8 activation at the DISC level. It remains to be determined how this caspase is activated in response to Fas agonists and whether the correlation observed between Fas-induced caspase-8 activation and c-FLIP expression is directly related to caspase-2L activity.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank François Martin and Ali Bettaieb for helpful advices and discussion. We are grateful to Dr D. Nicholson (Merck, Toronto, Canada) and A. Fontana (Lausanne, Switzerland) for providing us the polyclonal anti-caspase-3 Ab and Fas-L Neuro2A transfected cells, respectively.

REFERENCES

1. Itoh N, Yonehara S, Ishii A et al.The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell. 1991;66:233-243.

2. Oehm A, Behrmann I, Falk W et al. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily: Sequence identity with the Fas antigen. J Biol Chem. 1992;267:10709-10715.

3. Ju ST, Matsui K, Ozdemirli M. Molecular and cellular mechanisms regulating T and B cell apoptosis through Fas/FasL interaction. Int Rev Immunol. 1999;18:485-513.

4. De Maria R, Testa U, Luchetti L et al. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. Blood. 1999;93:796-803.

5. Micheau O, Solary E, Hammann A, Martin F, Dimanche-Boitrel MT. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to Fas-mediated cytotoxicity. J Natl Cancer Inst. 1997;89:783-789.

6. Fulda S, Strauss G, Meyer E, Debatin KM. Functional CD95 ligand and CD95 death-inducing signaling complex in activation-induced cell death and doxorubicin-induced apoptosis in leukemic T cells. Blood. 2000;95:301-308.

7. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. EMBO J. 1995;14:5579-5588.

8. Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell. 1997;88:355-365.

9. Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. J Biol Chem. 1995;270:7795-7798.

10. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell. 1995;81:505-512.

11. Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J et al. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:7464-7469.

12. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. Cell. 1996;85:817-822.

13. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. Cell. 1996;85:803-815.

14. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death Differ.1999;6:1028-1042.

15. Stennicke HR, Salvesen GS. Catalytic properties of the caspases. Cell Death Differ. 1999;6:1054-1059.

16. Kumar S. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. Cell Death Differ. 1999;6:1060-1066.

17. Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. Nature. 1996;380:723-726.

18. Irmler M, Thome M, Hahne M et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. Nature. 1997;388:190-195.

19. Hu S, Vincenz C, Buller M, Dixit VM. A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. J Biol Chem. 1997;272:9621-9624.

20. Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM. I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. J Biol Chem. 1997;272:17255-17257.

21. Srinivasula SM, Ahmad M, Ottilie S et al. FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. J Biol Chem. 1997;272:18542-18545.

22. Goltsev YV, Kovalenko AV, Arnold E, Varfolomeev EE, Brodianskii VM, Wallach. CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. J Biol Chem. 1997;272:19641-19644.

23. Inohara N, Koseki T, Hu Y, Chen S, Nunez G. CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:10717-10722.

24. Han DKM, Chaudhary PM, Wright ME et al. MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:11333-11338.

25. Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S et al. Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. Cell Death Differ. 1998;5:271-288.

26. 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.

27. Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. J Biol Chem. 1999;274:22532-22538.

28. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 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.

29. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell. 1998;94:491-501.

30. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M et al. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. J Exp Med. 1995;182:367-377.

31. Kluck RM, Bossy-Wetzel 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.

32. Kluck RM, Martin SJ, Hoffman BM, Zhou JS, Green DR, Newmeyer DD. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a Xenopus cell-free apoptosis system. EMBO J. 1997;16:4639-4649.

33. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature. 1999;397: 441-446.

34. Cain K, Bratton SB, Langlais C et al. Apaf-1 Oligomerizes into Biologically Active ~700-kDa and Inactive ~1.4-MDa Apoptosome Complexes. J Biol Chem. 2000;275:6067-6070.

35. Kuida K. Caspase-9. Int J Biochem Cell Biol. 2000;32:121-124.

36. Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. Genes Dev. 1999;13:3179-3184.

37. Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H, Yuan J. Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. Cell. 1994;78:739-750.

38. Kumar S, Kinoshita M, Noda M, Copeland NG, Jenkins NA. 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 Dev. 1994;8:1613-1626.

39. Bergeron L, Perez GI, Macdonald G et al. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. Genes Dev. 1998;12:1304-1314.

40. Harvey NL, Butt AJ, Kumar S. Functional activation of Nedd2/ICH-1 (caspase-2) is an early process in apoptosis. J Biol Chem. 1997;272:13134-13139.

41. Kumar S. Inhibition of apoptosis by the expression of antisense Nedd2. FEBS Lett. 1995;368:69-72.

42. Stefanis L, Troy CM, Qi H, Shelanski ML, Greene LA. Caspase-2 (Nedd-2) processing and death of trophic factor-deprived PC12 cells and sympathetic neurons occur independently of caspase-3 (CPP32)-like activity. J Neurosci. 1998;18:9204-9215.

43. Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. Cancer Res. 1997;57:615-619.

44. Duan H, Dixit VM. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. Nature. 1997;385:86-89.

45. Slee EA, Harte MT, Kluck RM et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. J Cell Biol. 1999;144:281-292.

46. 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.

47. Micheau O, Solary E, Hammann A, Dimanche-Boitrel MT. Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. J Biol Chem. 1999;274:7987-7992.

48. Bertrand R, Sarang M, Jenkin J, Kerrigan D, Pommier Y. Differential induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor cell lines with amplified c-myc expression. Cancer Res. 1991;51:6280-6285.

49. Sordet O, Bettaieb A, Bruey JM, Eymin B, Droin N, Ivarsson M, Garrido C, Solary E. Selective inhibition of apoptosis by TPA-induced differentiation of U937 leukemic cells. Cell Death Differ. 1999;6:351-361.

50. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J Immunol. 1992;148:2207-2216.

51. 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.

52. 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.

53. Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD, Wong WW. Substrate specificities of caspase family proteases. J Biol Chem. 1997;272:9677-9682.

54. Gregoli PA, Bondurant MC. Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors. J Cell Physiol. 1999; 178:133-143.

55. Rehemtulla A, Hamilton CA, Chinnaiyan AM, Dixit VM. Ultraviolet radiation-induced apoptosis is mediated by activation of CD-95 (Fas/APO-1). J Biol Chem. 1997;272:25783-25786.

56. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell. 1996;87:171.

57. Woo M, Hakem A, Elia AJ, Hakem R, Duncan GS, Patterson BJ, Mak TW. In vivo evidence that caspase-3 is required for Fas-mediated apoptosis of hepatocytes. J Immunol. 1999;163:4909-4916.

58. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. Mol Cell Biol. 2000;20:929-935.

59. Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. J Biol Chem. 1999;274:1541-1548.

60. Hitoshi Y, Lorens J, Kitada SI et al. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. Immunity. 1998;8:461-471.

61. Algeciras-Schimnich A, Griffith TS, Lynch DH, Paya CV. Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. J Immunol. 1999;162:5205-5211.

62. Kataoka T, Schroter M, Hahne M et al. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. J Immunol. 1998;161:3936-3942.

63. Leverkus M, Neumann M, Mengling T et al. Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes. Cancer Res. 2000;60:553-559.

64. Perlman H, Pagliari LJ, Georganas C, Mano T, Walsh K, Pope RM. FLICE-inhibitory protein expression during macrophage differentiation confers resistance to fas-mediated apoptosis. J Exp Med. 1999;190:1679-1688.

65. Wang J, Lobito AA, Shen F, Hornung F, Winoto A, Lenardo MJ. Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP. Eur J Immunol. 2000;30:155-163.

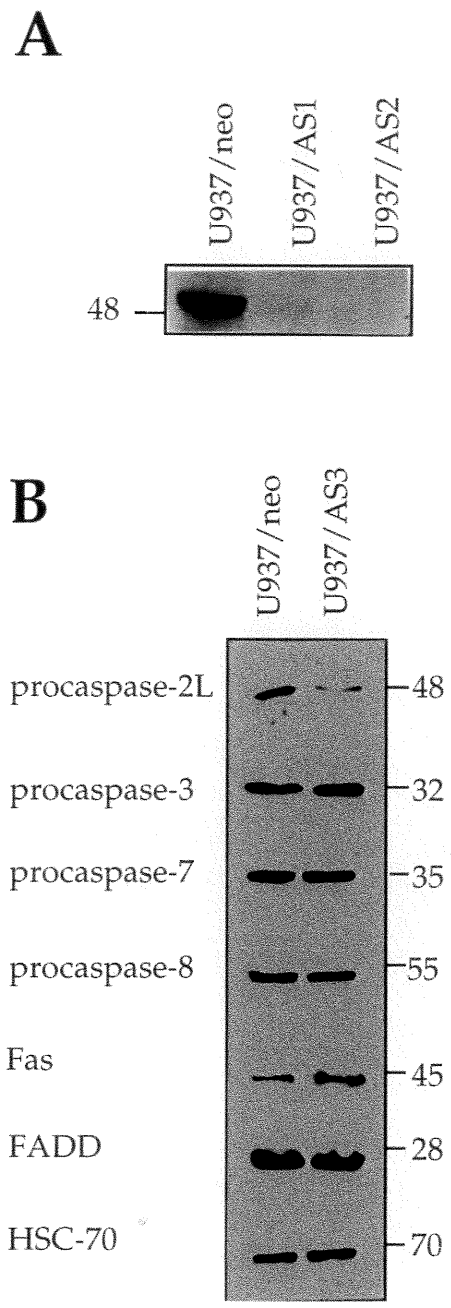


Figure 1 : Characterization of U937 cells stably transfected with *CASP2L/AS*.

U937/AS1 and U937/AS2 are two mixed cell populations transfected with an *CASP2L/AS*. U937/neo and U937/AS3 are two clones selected after transfection with empty pTARGET and *CASP2L/AS* vectors, respectively. *A)* Western blot analysis of procaspase-2L expression in U937/AS1 and U937/AS2 cells. *B)* Western blot analysis of procaspase-2L, -3, -7, -8, FADD and Fas expression in U937/neo and U937/AS3 cells. HSC-70 expression level was used for loading control.

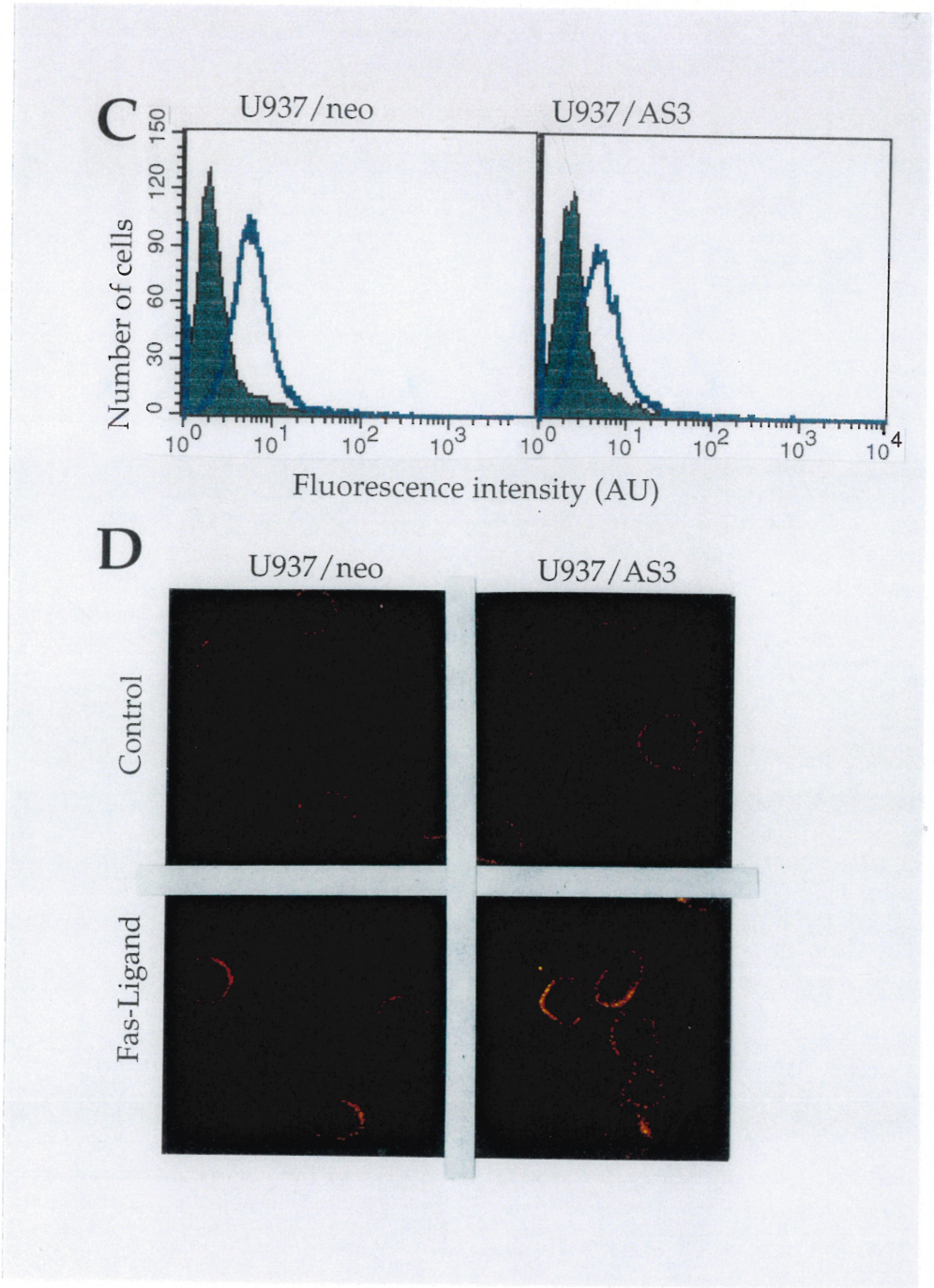


Figure 1 : Characterization of U937 cells stably transfected with *CASP2L/AS*.

C) Flow cytometry analysis of Fas expression (open area) on plasma membrane of U937/neo and U937/AS3 cells. An isotype-matched non relevant Ab was used as negative control (filled area). *D)* Confocal microscopy analysis of Fas expression in control and FasL (5U/ml; 3 h) treated U937/neo and U937/AS3 cells (magnification X 40).

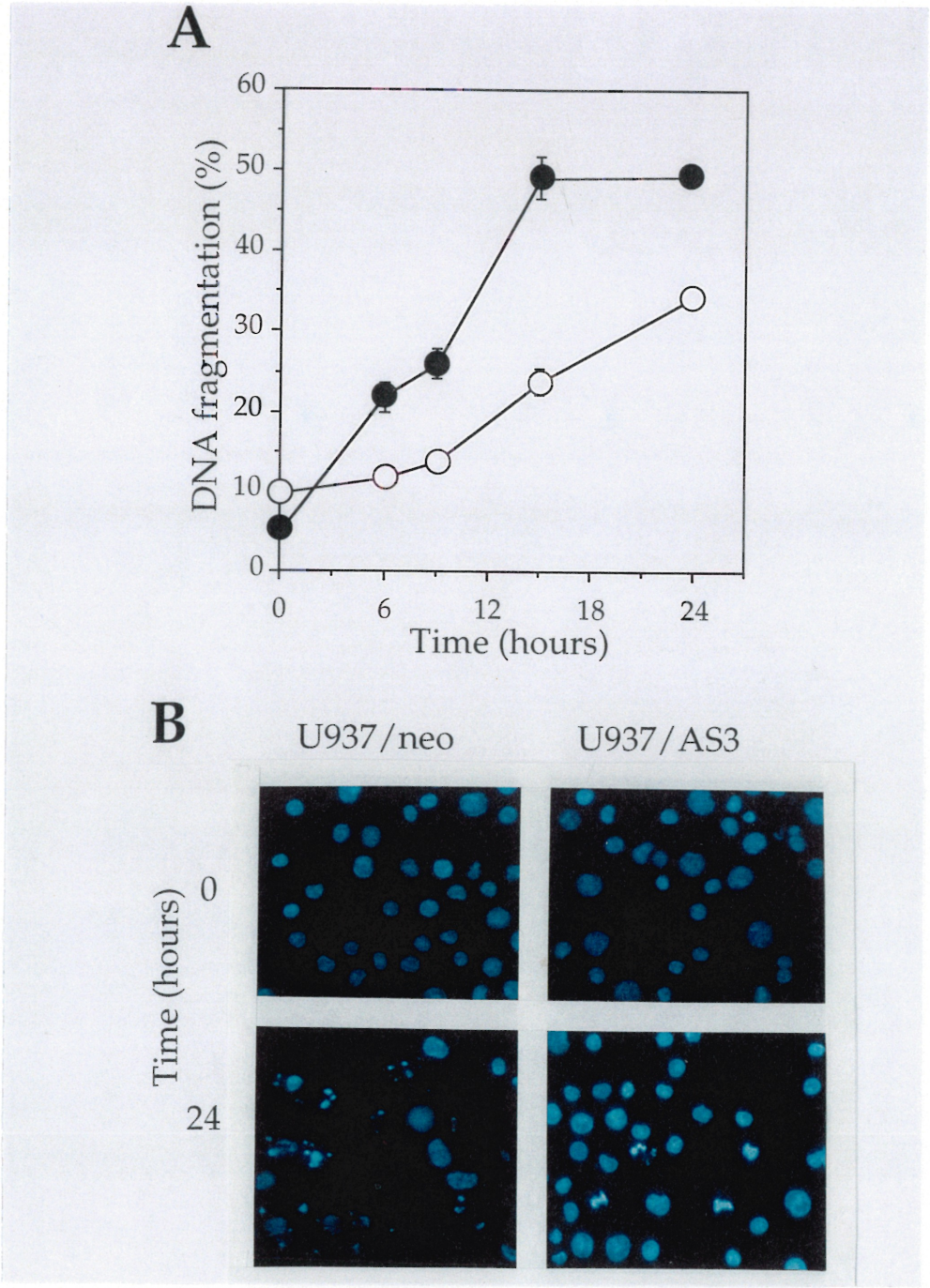


Figure 2. Down regulation of procaspase-2L expression delays anti-Fas Ab-induced apoptosis in U937/AS3 cells.

A) At indicated times after anti-Fas Ab treatment (x axis; h), DNA fragmentation was quantified by a DNA filter elution assay in U937/neo (filled circles) and U937/AS3 (open circles) cells. Data points, means of 2 independent experiments in triplicate; bars, SD. B) Morphological aspect of control and anti-Fas Ab-treated (CH11 50 ng/ml, CHX 0.8 µg/ml; 24 h) U937/neo and U937/AS3 cells stained by Hoeschst 33342 (magnification : X 40).

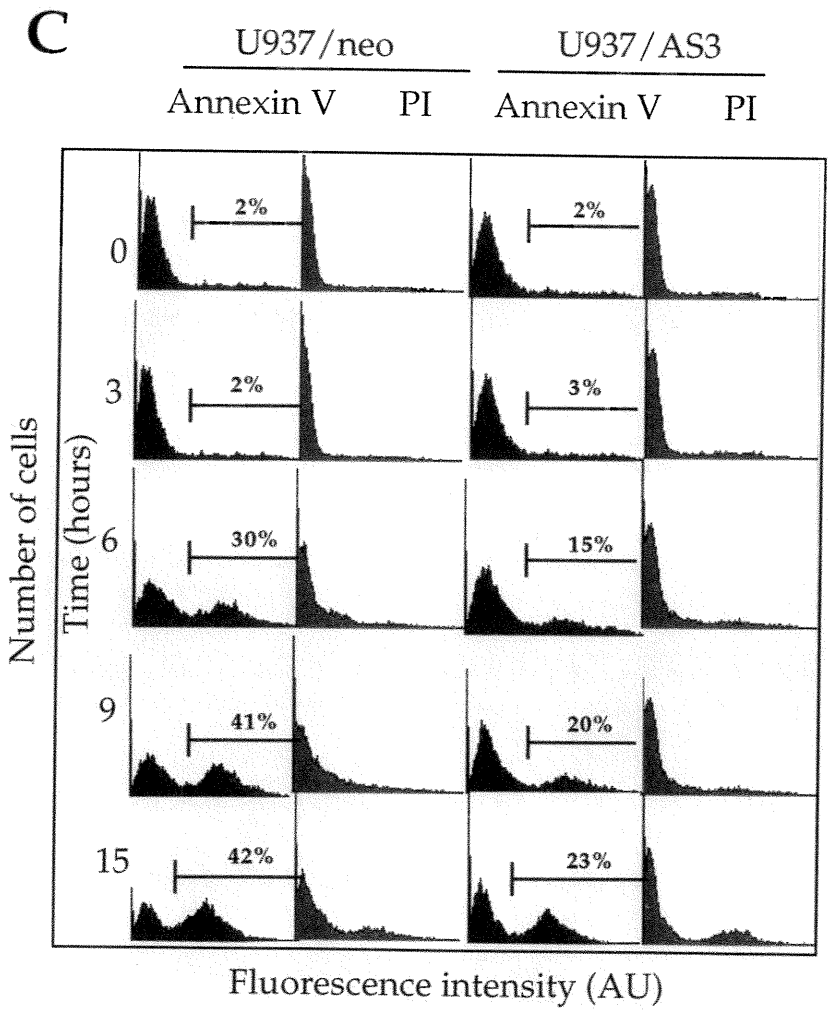


Figure 2. Down regulation of procaspase-2L expression delays anti-Fas Ab-induced apoptosis in U937/AS3 cells.

C) Flow cytometry profile of FITC-conjugated annexin V(Annexin V) and propidium iodide (PI)-labeled U937/neo and U937/AS3 at various times after anti-Fas Ab treatment. Percentages of annexin V-positive cells are indicated. The percentage of labeled cells with PI did not exceed 10%, 15 h after treatment.

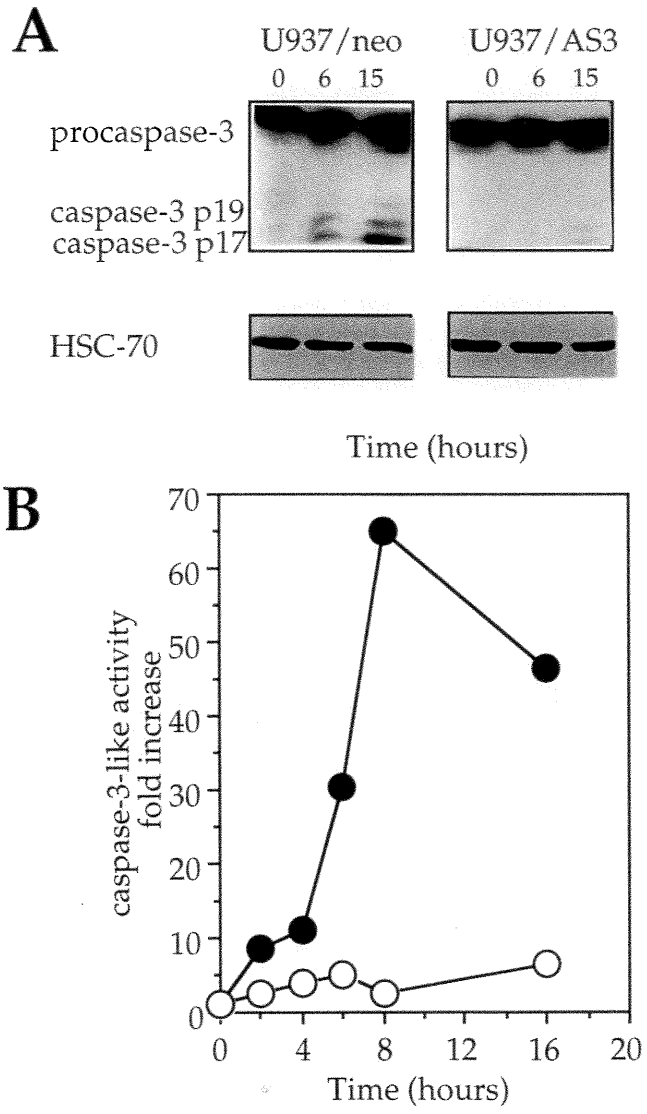


Figure 3 : Decreased expression of procaspase-2L prevents activation of the mitochondrial pathway to cell death.

A) The appearance of the active p19 and p17 fragments of caspase-3 was detected by Western blot analysis in U937/neo and U937/AS3 after anti-Fas Ab treatment. HSC-70 expression level is shown as protein loading control in each lane. B) Kinetics of DEVD-AMC hydrolysis in U937/neo (closed circles) and U937/AS3 (open circles) cells. Enzyme activities were measured as initial velocities and expressed relative to control untreated cells. One representative of two independent experiments is shown.

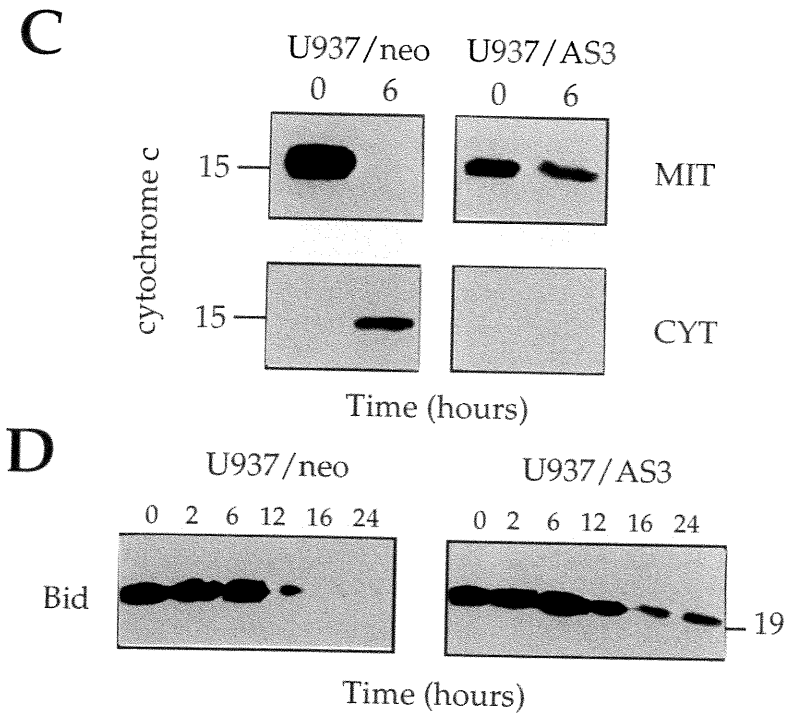


Figure 3 : Decreased expression of procaspase-2L prevents activation of the mitochondrial pathway to cell death.

C) Subcellular localization of cyctochrome c was performed from enriched mitochondrial (MIT) and cytosolic (CYT) extracts prepared from control and anti-Fas Ab-treated (6 h) U937/neo and U937/AS3 cells. D) Expression of Bid was monitored in U937/neo and U937/AS3 cells by western blot analysis at indicated times after anti-Fas Ab treatment.

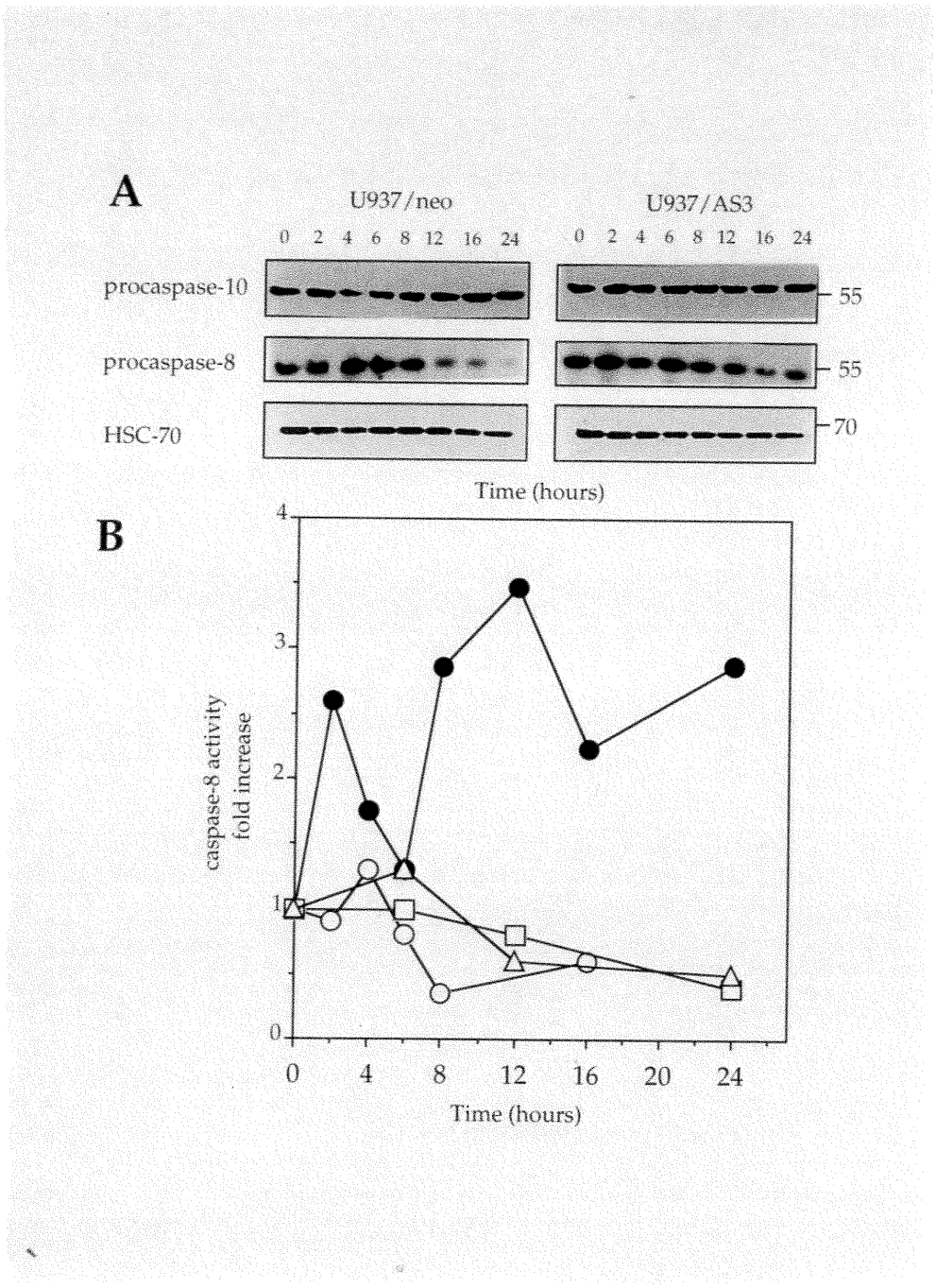


Figure 4. Decreased expression of procaspase-2L prevents anti-Fas Ab-mediated procaspase-8 activation.

A) Western blot analysis of procaspase-10 and procaspase-8 expression in U937/neo and U937/AS3 cells at indicated times (x axis; h) after anti-Fas Ab treatment. HSC-70 expression level is used as protein loading control. One representative of three independent experiments is shown. B) Kinetics of IETD-AFC hydrolysis in U937/neo (closed circles), U937/AS3 (open circles), U937/AS1 (open squares) and U937/AS2 (open triangles) cells. Enzyme activities were measured as initial velocities and expressed as relative to control untreated cells.

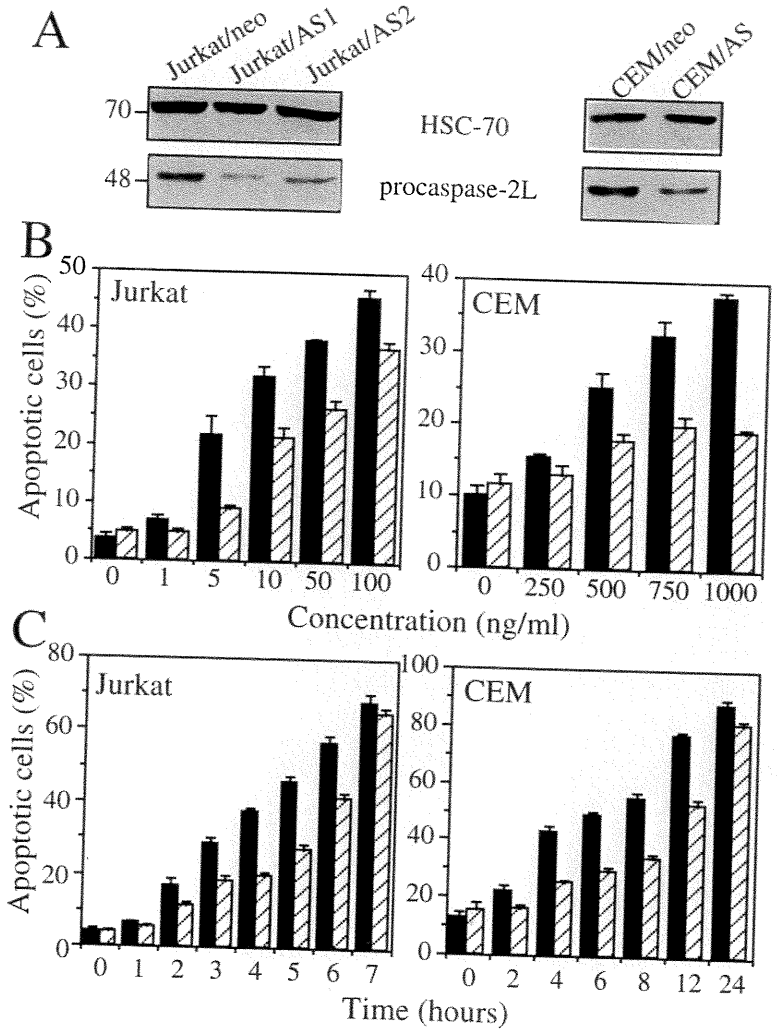


Figure 5. *CASP2L/AS* transfection delays anti-Fas Ab-mediated apoptosis in Jurkat and CEM cell lines.

A) Western blot analysis of procaspase-2L in Jurkat (Jurkat/AS1 and Jurkat/AS2) and CEM (CEM/AS) mixed cell populations compared to those transfected with the empty vector (Jurkat/neo and CEM/neo). B) Jurkat and CEM cells were exposed to 50 ng/ml and 1 μg/ml CH11 Ab concentrations for 3 h, respectively; C) Jurkat and CEM cells were exposed for indicated times to 50 ng/ml and 1 μg/ml CH11 Abs, respectively. B and C) Apoptosis was determined by Hoechst 33342 staining (mean ± SD of 3 independent experiments).

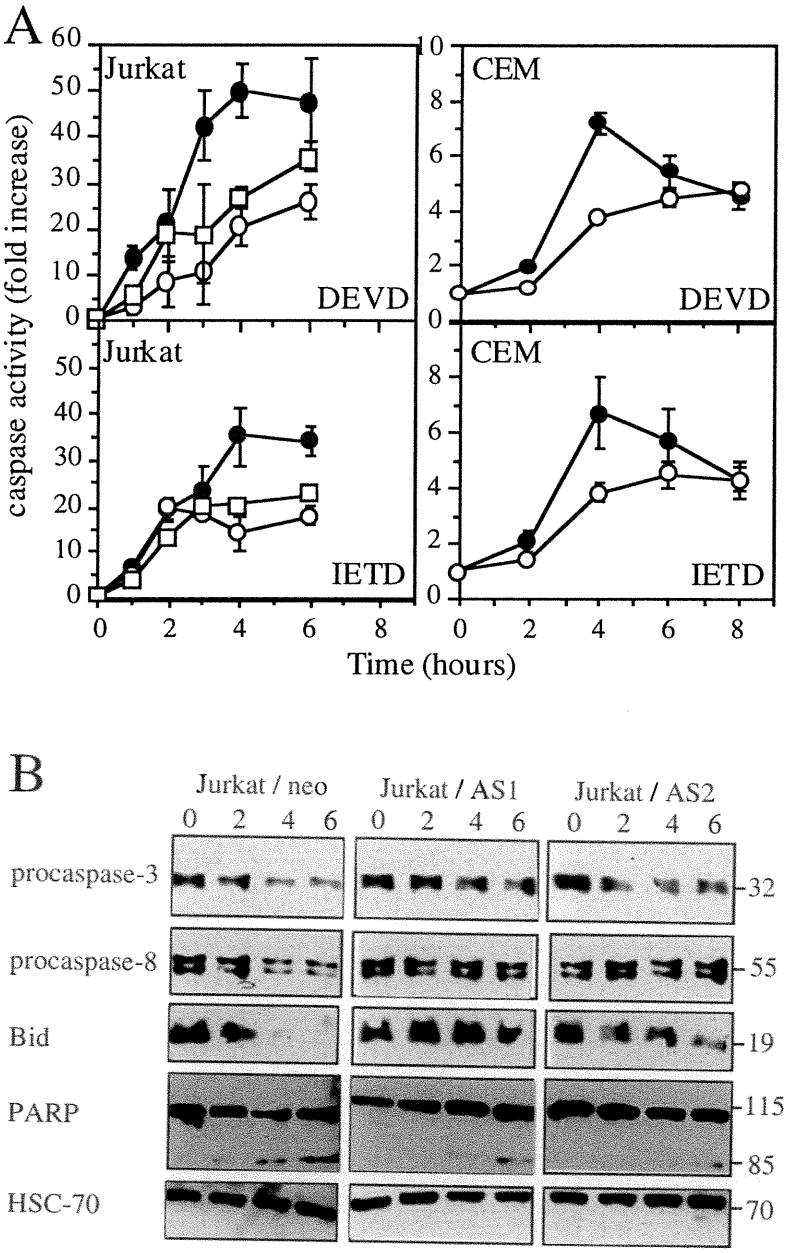


Figure 6. Western blot analyses in Jurkat cells exposed to anti-Fas Abs.

Jurkat and CEM cells were exposed for indicated times to 50 ng/ml and 1 μg/ml CH11 Abs, respectively. A) DEVDase and IETDase activities were measured in Jurkat/neo (closed circles), Jurkat/AS1 (open circles), Jurkat/AS2 (open squares), CEM/neo (closed circles) and CEM/AS (open circles) as initial velocities. Results were related to those obtained in untreated cells (One representative of 2 experiments: SD : samples in triplicate). B) Western blot analysis of indicated proteins in Jurkat/neo and Jurkat/AS cells exposed for indicated times to 50 ng/ml CH11 anti-Fas Abs.

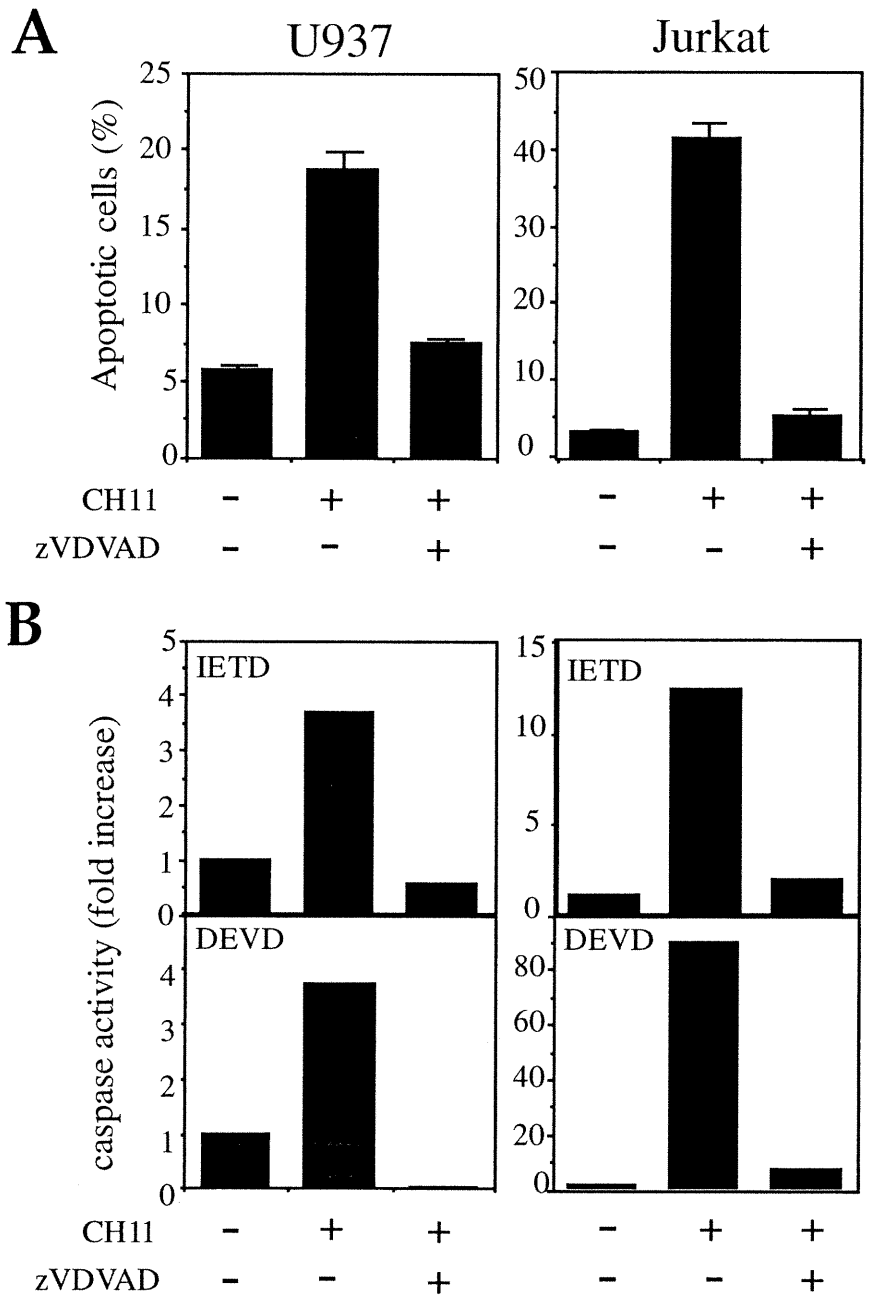


Figure 7. The caspase-2 permeant inhibitor Z-VDVAD-fmk prevents Fas-induced apoptosis of parental U937 and Jurkat cells.

Z-VDVAD (50 μM) was added to cell culture in combination with CH11 anti-Fas Abs (50 ng/ml), in the presence (U937) or absence (Jurkat) of CHX (0.8 μg/ml) for 3.5 hours. A) Apoptosis was determined by Hoechst 33342 staining of nuclear chromatin (mean ± SD of 3 experiments). B) DEVDase and IETDase activities were measured as initial velocities. Results were related to those obtained in untreated cells (one representative of 2 experiments).

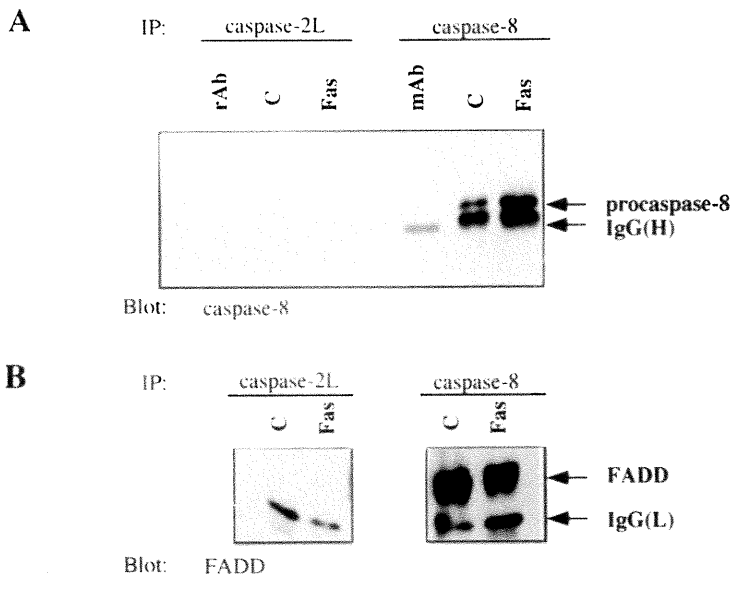


Figure 8. Lack of interaction of procaspase-2L with FADD and procaspase-8 in anti-Fas Ab-treated U937 cells.

Co-immunoprecipitation (IP) experiments from control (c) and anti-Fas Ab-treated (Fas; 6 h) U937/neo cells were performed with anti-caspase-2L or anti-caspase-8 Abs. Western blot analysis were revealed with anti-caspase-8 (A) and anti-FADD (B) Abs. Abs used to perform IPs were loaded as control (rAb and mAb).

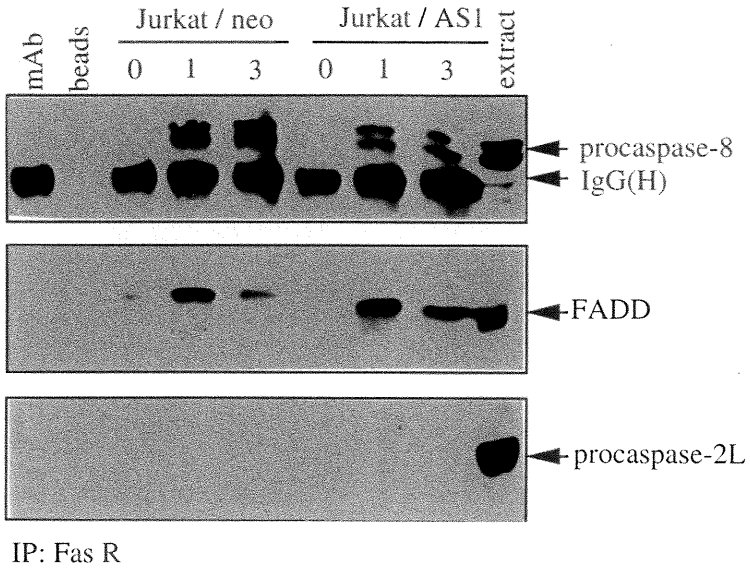


Figure 9. Decreased expression of procaspase-2L does not inhibit the formation of the DISC.

Jurkat/neo and Jurkat/AS1 cells were treated for indicated time with recombinant FasL. Immunoprecipitation (IP) with an anti-Fas receptor Ab was followed by immunoblot detection of FADD, procaspase-8 and procaspase-2L. Controls include the Ab alone (mAb), beads incubated in the absence of Ab (beads) and Jurkat cell extracts (extract).

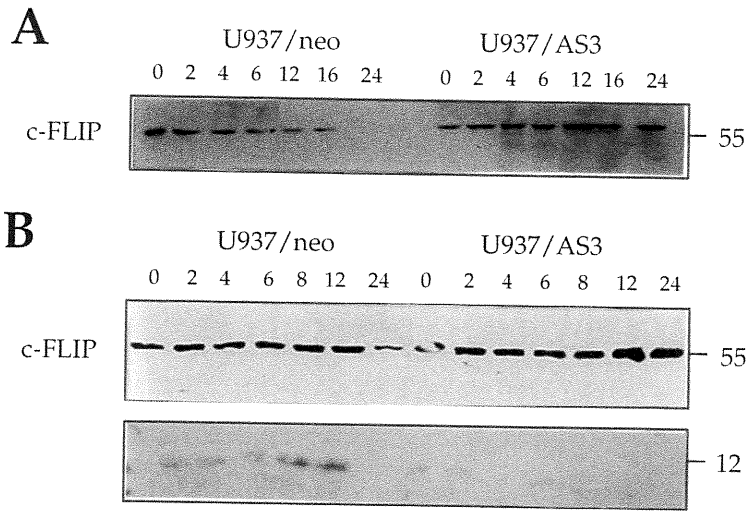


Figure 10. Decreased expression of procaspase-2L prevents anti-Fas Ab-induced c-FLIP cleavage.

Kinetics of c-FLIP expression was monitored in U937/neo and U937/AS3 cells by Western blot analysis with two different Abs at the indicated times after anti-Fas Ab treatment. A) Anti-c-FLIP polyclonal Ab from Upstate detected the 55 kDa native protein B) Anti-c-FLIP polyclonal Ab from Pharmingen also detected a faint 12 kDa band corresponding to a cleavage product.

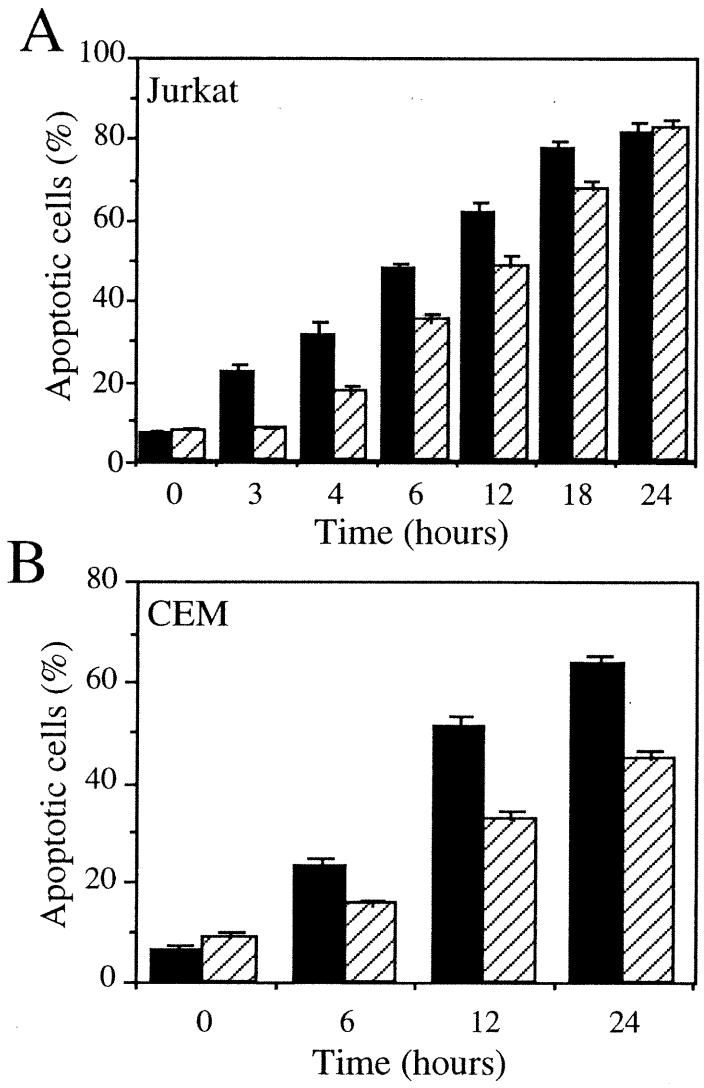


Figure 11. TRAIL-induced apoptosis is delayed in *CASP2L/AS*-transfected cells.

Apoptosis induced by 100 (Jurkat) to 200 (CEM) ng/ml of recombinant TRAIL was quantified by staining nuclear chromatin with Hoechst 33342 in Jurkat/neo (black bars), Jurkat/AS1 (hatched bars), CEM/neo (black bars) and CEM/AS (hatched bars). Results are the mean ± SD of 3 independent experiments.

CHAPITRE 4 Rôle de la procaspase-2S dans l'apoptose des cellules leucémiques humaines induite par l'étoposide.

4.1 - Modulation of apoptosis by procaspase-2 short isoform: selective inhibition of chromatin condensation, apoptotic body formation and phosphatidylserine externalization

Les travaux de Wang *et coll.*, en 1994, avaient suggéré que, au moins dans certaines situations, l'isoforme courte de la caspase-2 avait un effet anti-apoptotique (cellules Rat-1 privée de sérum) et l'analyse des souris caspase-2 -/- avait également suggéré cette dualité de la caspase-2. Pour déterminer si la procaspase-2S a un rôle anti-apoptotique dans notre système, nous avons cloné l'ADNc de *CASP-2S* en orientation sens dans le vecteur d'expression eucaryote pTarget que nous avons ensuite transfecté de façon transitoire dans la lignée leucémique humaine U937. En se basant sur l'aspect morphologique des cellules colorées par le Hoechst 33342, nous avons observé que la surexpression de la procaspase-2S protégeait de l'apoptose induite par l'étoposide, ainsi que par l'anticorps agoniste de Fas CH11.

Afin de déterminer le mécanisme d'action de la procaspase-2S, nous l'avons surexprimée par transfection stable dans la lignée U937 et avons sélectionné un clone U-WT1 et une population mixte U-WT2 surexprimant la procaspase-2S. Par mutagénèse dirigée, nous avons modifié la cystéine du motif QACRG de la procaspase-2S et avons également transfecté de manière stable cette procaspase-2S mutée dans les cellules U937. Les 2 populations cellulaires ainsi obtenues ont été dénommées U-Mut1 et U-Mut2.

La comparaison des cellules contrôles et du clone U-WT1 surexprimant la procaspase-2S nous a permis d'observer, après traitement par l'étoposide, un retard au niveau de la condensation de la chromatine, de la formation des corps apoptotiques et de l'externalisation des phosphatidylsérines. Par contre, aucune différence

concernant la fragmentation internucléosomale de l'ADN n'a été observée. Ces résultats, confirmés dans une population mixte, nous ont suggéré que la procaspase-2S n'interferait qu'avec certains marqueurs de l'apoptose.

Nous avons alors cherché à comprendre à quel niveau se situait l'intervention de la procaspase-2S dans la cascade protéolytique conduisant à la mort cellulaire. Au cours de l'apoptose induite par l'étoposide, nous avons observé que la surexpression de la procaspase-2S n'interférait pas avec l'activation de la procaspase-3 en ses fragments actifs p17 et p19, ni avec celle de la procaspase-7 en son fragment actif p10, ni avec l'expression de l'actine, de Bcl-2 ou de Bax. Cependant, la consommation de la proforme de la procaspases-2L traduisant son activation, n'est pas observée dans les cellules surexprimant la procaspase-2S. Cet effet de l'isoforme courte de la procaspase-2 sur l'activation de la forme longue a été confirmé en mesurant l'activité VDVADase, substrat spécifique de la caspase-2, dans les cellules traitées par l'étoposide.

Nous avons également eu la surprise de constater que la mutation de la cystéine de la séquence QACRG supprimait la capacité de la procaspase-2S à interférer spécifiquement avec certains aspects phénotypiques de l'apoptose.

En conclusion, l'isoforme courte interfère avec certains aspects phénotypiques de l'apoptose des cellules leucémiques induite par l'étoposide, en particulier avec la formation des corps apoptotiques. Cet effet s'accompagne d'une inhibition de l'activation de l'isoforme longue de la caspase-2 et implique la cystéine du motif QACRG.

Modulation of apoptosis by procaspase-2 short isoform : selective inhibition of chromatin condensation, apoptotic body formation and phosphatidylserine externalization

Role of caspase-2S in apoptosis

Nathalie Droin[1,2], Cedric Rébé[1], Florence Bichat[1], Arlette Hammann[1], Richard Bertrand[2,3] and Eric Solary[1,3].

INSERM U517, Faculties of Medicine & Pharmacy, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21033 Dijon, France[1] and Research Centre of University of Montreal Hospital Centre, Notre Dame Hospital, 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec H2L 4M1 Canada[2].

[3] The two senior authors contributed equally to this work and are listed by alphabetic order.

Cédric Rébé et Florence Bichat ont participé à ce projet en vérifiant les mesures des activités caspases.

Arlette Hammann a analysé l'annexine V au FACS.

ABSTRACT

Procaspase-2 is one of the cysteine aspartate proteases involved in apoptotic cell death. Alternative splicing of *CASP-2* messenger RNA generates a long isoform, procaspase-2L, whose overexpression induces cell death, and a truncated isoform, procaspase-2S, whose function remains poorly defined. The present study explored the consequences of procaspase-2S overexpression in U937 human leukemic cells exposed to the topoisomerase II inhibitor etoposide as an apoptotic stimulus. Overexpression of procaspase-2S in U937 cells partially prevented nuclear changes associated with etoposide-induced cell death, as determined by Hoechst 33342 staining of nuclear chromatin and electron microscopy studies. Procaspase-2S also prevented the maturation of apoptotic bodies, delayed phosphatidylserine externalization on the plasma membrane and prevented the cleavage and activation of procaspase-2L. These effects were not observed when the cysteine 289 in the consensus QACRG motif was mutated into a serine. Wild-type procaspase-2S overexpression did not influence the cleavage of procaspase-3, procaspase-7 and poly(ADP-ribose)polymerase nor the fragmentation of nuclear DNA into nucleosome-sized fragments. Altogether, these results indicate that the short isoform of procaspase-2 negatively interferes with specific features of apoptosis, an activity that is suppressed by the C289S mutation in the protein.

INTRODUCTION

Apoptosis has been initially described as a stereotyped sequence of structural changes that begin with the aggregation of the chromatin in large compact granular masses underlying the nuclear membrane, the condensation of the cytoplasm and the blebbing of the plasma membrane. At a later stage, the nucleus has usually broken up into a number of discrete fragments containing highly condensed chromatin while the overall compaction of the cytoplasm is associated with the appearance of translucent cytoplasmic vacuoles. Finally, the protuberances on the cell surface form membrane-bound apoptotic bodies of roughly spherical or ovoid shape and varying size, that contain cytoplasmic elements and/or highly condensed nuclear fragments. These apoptotic bodies, dispersed in intercellular tissue space, are recognized and engulfed by neighboring cells (Wyllie *et al.*, 1980), due to modifications in the plasma membrane structure, e.g. externalization of the negatively charge phosphatidylserine (Fadok *et al.*, 2000).

In many forms of apoptosis, dying cells activate a series of cysteine aspartic proteases known as caspases that ensure limited digestion of critical cellular components from the inside. Caspases are synthesized as inactive proenzymes, including an aminoterminal prodomain, a large subunit containing the consensus motif QACXG and a small subunit, that must be cleaved at key aspartate residues to be activated (Earnshaw *et al.*, 1999). Functional homologies led to distinguish the caspase-1 family (caspase-1, -4, -5, -11, -12 and -14) that is mainly involved in cytokine maturation, from the caspase-3 family (caspase-3, -6, -7, -8, -9, -10) that plays a central role in apoptosis. In this latter family, enzymes with a short prodomain (caspase-3, -6 and -7) were proposed to function as downstream effectors of a cascade in which enzymes with a long prodomain function as upstream signal transducers (Kumar, 1999). Actually, studies performed in cell-free systems have shown that caspase-3 and -7 can cleave and activate caspases with a long prodomain (Slee *et al.*, 1999; Van de Craen *et al.*, 1999).

Caspase-2 is a long prodomain containing enzyme that is activated in many cell types in response to various apoptotic stimuli (Wang *et al.*, 1994). Its prodomain is essential for oligomerization, autoactivation, nuclear

migration and interaction with the adaptor molecule RAIDD (Duan and Dixit, 1997) also known as CRADD (Ahmad *et al.*, 1997). Alternative splicing of *CASP-2* mRNA generates a long isoform, procaspase-2L, whose overexpression induces cell death, and a truncated isoform, procaspase-2S, that is devoid of the small subunit and was reported to antagonize cell death induced by serum withdrawal (Wang *et al.*, 1994). The dual effect of the enzyme was also suggested by analysis of caspase-2-deficient mice (Bergeron *et al.*, 1998). The long isoform of procaspase-2 has been localized to the cytoplasm, the mitochondria, the Golgi complex and the nucleus (Colussi *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1999a; Mancini *et al.*, 2000). Interaction of its prodomain with the adaptor molecule RAIDD/CRADD could connect procaspase-2L to the tumor necrosis factor receptor (Duan and Dixit, 1997). In a cell-free system, procaspase-2L is cleaved by effector caspases such as caspase-3, suggesting its possible involvement downstream in the caspase cascade (Slee *et al.*, 1999; Van de Craen *et al.*, 1999). Upon apoptotic stimulation, procaspase-2L accumulates in the nucleus where it colocalizes with RAIDD/CRADD to dot-like and filamentous structures (Shearwin-Whyatt *et al.*, 2000) and in the Golgi apparatus where it cleaves golgin-160 (Mancini *et al.*, 2000).

The role of the short isoform of procaspase-2 remains poorly understood. The present study tested the influence of its overexpression in the U937 human leukemic cell line on the various apoptotic features induced by exposing these cells to the topoisomerase II inhibitor etoposide. Since the cysteine of the consensus motif QACXG is required for the proteolytic activity of caspases, we also studied whether mutation of the cysteine 289 in the QACRG sequence of procaspase-2S could modify the consequences of the protein overexpression.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture, drug treatment and chemicals. The U937 human leukemia cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and was grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactived fetal calf serum and 2 mM L-glutamine in an atmosphere of

95 % air and 5% CO_2 at 37°C. All cell culture products were purchased from Biowhittaker (Fontenay-sous-bois, France). Etoposide was obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and stock solution (50 mM) in dimethylsulfoxide was aliquoted and stored at -80°C. Further dilutions were made in culture medium prior to use. All other chemicals were of reagent grade and purchased from Sigma-Aldrich, ICN BioMedicals (Costa Mesa, CA), Roche Molecular Biochemicals (Meylan, France) and local sources.

cDNA cloning and cell transfection. The human *CASP-2S* cDNA was obtained by RT-PCR from U937 cell mRNA (Droin *et al.*, 1998) and cloned in pTarget vector (Promega, Charbonnières, France). The sequence of the cDNA was checked to fit with the published sequence for CASP2S (GenBank accession number : U13022). *CASP-2s* site-directed mutagenesis was performed by using a pTARGET plasmid encoding the full lenght procaspase-2S. The couple of primers used to generate mutation of catalytic cystein were primer sense 5'-ATGCATCCTCATCATCAGGAA-3' and primer antisense 5'-CGGCCGCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTAGAG CAAGAGAGGCGGTGGCAGCAGTGAACAGAAGGAGGTGCCCAAGGG ATCCAATAGCACCTCCACGGGAGGCCTG-3' containing the mutation and an His-tag . Transient transfections were performed using Superfect^R transfection reagent (Qiagen SA, Courtaboeuf, France) by washing U937 cells in PBS, plating 7.5 x 10^6 cells in 60-mm dishes and dissolving 5 µg of the tested plasmid combined with 5 µg of the Enhanced Green Fluorescent Protein plasmid (Clontech, Montigny le Bretonneux, France) in growth medium. Cells were incubated 10 min at room temperature with the plasmids in the presence of 20 µl of Superfect^R reagent and were tested 48 h latter. Stable transfection was performed by electroporation of 10 x 10^6 cells with 10 µg plasmid DNA and selection was done by culturing the cells for 4 weeks in the presence of 1 mg/ml geneticin (G418). Expression of the plasmid was monitored by PCR on genomic DNA using the universal sense primer T7 and the antisense primer 5'-CCCGGGGGTACCGTCGACTGCGGC CGC-3'. Amplified DNA was analyzed on 1.2% agarose gel stained with ethidium bromide.

Antibodies and caspase-2 substrate. The polyclonal rabbit anti-apopain antibody (Ab) that recognizes procaspase-3 and its p19 and p17 subunits was kindly provided by Dr D. Nicholson (Merck, Toronto, Canada). The anti-procaspase-2 Ab (clone G310-1248) was obtained from Pharmingen (San Diego, CA) and recognizes both procaspase-2L and procaspase-2S isoforms. Other Abs used were directed against human procaspase-7 (R&D System, Oxon, UK), procaspase-2L (sc-625) and Hsc70 (sc-7298) from SantaCruz (Santa Cruz, CA), Bax (clone 4F11, Immunotech, Marseille, France), Bcl2 (Dako, Denmark), actin (clone 5F8, InnoGenex, San Ramon, CA) and poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) (Boehringer Mannheim, Meylan, France). Goat horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PE). Enhanced chemiluminescence reagents (ECL) were from Amersham. The caspase-2 substrate z-VDVAD-AFC (benzyloxycarbonyl-Valine-Aspartate-Valine-Alanine-Aspartate-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin) was purchased from Calbiochem-Novabiochem Co (San Diego, CA).

Identification of apoptosis. DNA fragmentation was measured by using a previously reported DNA filter elution assay (Bertrand *et al.*, 1991) and expressed as percentage of fragmented relative to total DNA. DNA fragmentation was also visualized by extracting total DNA by a salting-out procedure (Miller *et al.*, 1988), then performing DNA electrophoresis in 1.8% agarose gel in Tris-borate-EDTA buffer (pH8.0) followed by ethidium bromide staining. The nuclear chromatin was stained with Hoechst 33342 for 30 min at 37°C for identifying morphological changes by fluorescence microscopy. For electron microscopy, cell fixation was performed in 0.1 M Milonig's phosphate buffer (pH 7.4) containing 2.5% glutaraldehyde. Then, cells were stained with 2% uranyl acetate and dehydrated by repeated ethanol treatments. Sections (500-700A) were stained in lead citrate and examined by transmission electron microscopy using a Ziess Em 10 CA microscope (JFE Enterprises, Brookville, MD). Flow cytometry monitory of size and granulation was performed by using a FACScan apparatus (Becton Dickinson, Grenoble, France). Exposure of phosphatidylserine on the outer plasma membrane leaflet was identified by Annexin V-FITC staining in the

presence of propidium iodide (Immunotech, Marseille, France) as described (Vermes et al., 1995). Briefly, cells were resuspended in 10 mM HEPES, pH7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$, in the presence of annexin V-FITC (1.0 mg/ml) and propidium iodide (1.0 mg/ml) for 10 min in the dark and analyzed by using a FACScan flow cytometer.

Western blots. For western blot analyses, cells were washed twice in PBS, lysed for 30 min in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% Na-SDS, 0.5% Na-desoxycholate) in the presence of protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 2.5 µg/ml pepstatin, 10 µg/ml aprotinin, 2.5 µg/ml trypsin inhibitor, 5 µg/ml leupeptin), then centrifuged at 15,000 X g for 20 min at 4°C. Supernatants were collected and 50 µg proteins were incubated in loading buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% b-mercaptoethanol, 4.6% SDS, 20% glycerol and 0.003% bromophenol blue) prior to SDS-PAGE on a 12-15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel. Following electrophoresis, proteins were electroblotted on PVDF membrane (Biorad, Yvry-sur-Seine, France). After blocking non-specific binding sites overnight with 5% nonfat milk in TPBS (PBS, 0.1% Tween 20), membranes were incubated for 2-3 h at RT with the primary Abs. After tree washes in TPBS, membranes were incubated with the corresponding peroxidase-conjugated secondary Abs for 30 min at RT. Immunoblots were revealed by ECL and autoradiography. For PARP cleavage analysis, cells were lysed in boiling lysis solution (1% SDS, 1 mmol/l Na-vanadate, 10 mmol/l Tris pH7.4).

Caspase-2 activity. Cells were homogeneized at 4°C for 30 min in a lysis buffer containing [100 mM HEPES (pH 7.5), 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 20%, 0.3% NP-40], centrifuged at 10,000 X g for 15 min at 4°C and supernatants were collected and frozen at -80°C. Fifty µg of proteins were used to measure caspase-2 activity. Fluorescence was monitored continuously in a dual luminescence fluorimeter (LS 50B Perkin Elmer) using excitation (400 nm) and emission (505 nm) wavelengths specific for caspase-2 substrate. Reactions were carried out at 37°C using a water-jacketed sample compartment. The assay mixture contained 100 mM HEPES (pH7.5), 20% glycerol, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 50 µM fluorogenic peptides and 50 µg

proteins per assay. Enzyme activities were determined as initial velocities and expressed as relative intensity/min/mg (Schmitt *et al.*, 1998).

RESULTS

Transient transfection of CASP-2S inhibits the nuclear features of apoptosis in U937 cells. The human *CASP-2S* cDNAs encoding the wild-type isoform and the C289S mutant, cloned in pTarget vector, were transiently expressed in U937 cells, in combination with GFP-encoding cDNA. Forty-eight hours later, we measured the ability of etoposide (50 µM for 5 hours) to induce apoptosis in GFP-positive cells. The nuclear features of apoptosis (chromatin condensation and nuclear fragmentation) were identified by staining nuclear chromatin with Hoechst 33342. As indicated on Figure 1, overexpression of *CASP-2S* delayed the appearance of apoptotic nuclear features in U937 cells exposed to etoposide. Similar results were obtained when the transiently transfected cells were exposed to anti-Fas mAbs (clone CH11 : 50 ng/ml + cycloheximide 0.8 µg/ml) (data not shown). Interestingly, the C289S mutation suppressed the ability of wild-type caspase-2S to delay cell death-related nuclear changes in cells exposed to etoposide (Figure 1) and anti-Fas Abs (not shown).

Stable overexpression of procaspase-2S modulates the morphological features of apoptosis in U937 cells. To further assess the role of procaspase-2S in apoptosis, wild-type and mutated *CASP2S* cDNAs were stably transfected in U937 cells. One clone transfected with the empty vector (U-Neo), one clone (U-WT1) and one mixed cell population (U-WT2) expressing *CASP2S* cDNA, and two mixed populations expression mutated *CASP2S* cDNA (U-Mut1 and U-Mut2) were selected for further experiments. PCR analysis of genomic DNA using primers recognizing vector polylinker sequences demonstrated the presence of the expressed cDNAs in *CASP2S*-transfected cells, not in U-Neo cells (Figure 2A). Western blot analysis of the transfected cells using an anti-human caspase-2 mAb identified a 48 kDa protein corresponding to procaspase-2L and a 35 kDa protein corresponding to procaspase-2S. This latter protein was overexpressed in cells transfected with

CASP2S cDNAs (Figure 2B). The ratio of caspase-2S to caspase-2L, as determined by scanning immunoblots, was at least five-fold increased in stably transfected cells (U-WT1 : x 5; U-WT2 : x 11; U-Mut1 : x 14; U-Mut2 : x 8).

We explored the ability of etoposide to induce apoptosis-related morphological changes in the various populations of U937 cells. Ultrastructural analysis of these cells by electron microscopy, revealed impressive differences. When U-Neo were treated with 50 µM etoposide for 5 hours (Figure 3A), they showed highly condensed chromatin into dense specks in shrinked cells and numerous vesicles of varying size and content, some of which being released to the extracellular space. In addition, U-Neo cells were fragmented into apoptotic bodies of varying size, some of them containing heavily condensed chromatin and vesicles. In contrast, when treated in the same conditions, cells overexpressing wild-type procaspase-2S (U-WT1 cells; Figure 3B) were much less dismantled, with limited condensation of the chromatin localized around the nuclear envelope. Their nuclei appeared lobulated or fragmented while their cytoplasm contained much less vesicles than U-Neo cells. The most striking difference between U-Neo and U-WT1 cells exposed to etoposide was the very low number of extracellular apoptotic bodies around cells overexpressing procaspase-2S. U937 cells transfected with the mutated *CASP2S* cDNA (U-Mut2) behave as U-Neo cells (Figure 3C), indicating that the cysteine 289 was required for caspase-2S to interfere with nuclear features of apoptosis and the formation of apoptotic bodies.

To further analyze the effect of caspase-2S on the morphological changes associated with etoposide-induced apoptosis, we performed kinetic experiments in which morphological changes were identified by combining phase contrast microscopy and nuclear chromatin staining with the Hoescht 33342 dye. By counting the number of cells with apoptotic morphology, based on the formation of chromatin dots, we observed that overexpression of wild-type procaspase-2S delayed chromatin condensation in U937 cells exposed to 50 µM etoposide, thus confirming the results obtained in transiently transfected cells (Table I). In addition, U-Neo cells were rapidly and heavily dismantled with the formation of apoptotic bodies. After a 30

hour-exposure to the drug, virtually all U-Neo cells were fragmented (Figure 4). In contrast, cells overexpressing procaspase-2S were much less disassembled, e.g. the extracellular space around the cells was cleaner with fewer apoptotic bodies (Figure 4). After a 30 hour-exposure to the drug, many U-WT1 cells demonstrated chromatin condensation without formation of apoptotic bodies. In these kinetic experiments, cells transfected with the C289S mutant behave as U-Neo cells, further suggesting that the cysteine 289 was required for the biological effects of caspase-2S. These morphological observations were confirmed by using flow cytometry to monitor the size and granulation of the various cell populations when exposed to 50 μM etoposide for various times. Figure 5 shows that both the size and the granulation scatters decrease more rapidly in U-Neo and U-Mut2 cells than in U-WT1 cells.

Overexpression of procaspase-2S delays phosphatidylserine externalization in etoposide-treated U937 cells. Another marker of apoptosis is the externalization of phosphatidylserine on the outer leaflet of the plasma membrane (Fadok *et al.*, 1992). Using FITC-labeled annexin V and propidium iodide labeling, we observed that etoposide-induced phosphatidyl serine externalization was significantly delayed in cells overexpressing wild-type procaspase-2S as compared to control U-Neo cells and cells expressing the C289S mutant. In all cases, most cells remained unlabeled by propidium iodide, indicating that the plasma membrane was not disrupted (Figure 6).

Overexpression of procaspase-2S does not prevent oligonucleosome-sized DNA fragmentation in etoposide-treated U937 cells. Another typical feature of etoposide-induced nuclear apoptosis in U937 cells is internucleosomal DNA fragmentation. By using a DNA filter elution assay to quantify DNA fragmentation, we observed that overexpression of either wild-type or mutated procaspase-2S had no significant influence on etoposide-induced DNA fragmentation (Figure 7A). The specificity of DNA fragmentation monitored by the DNA filter elution assay was confirmed by agarose gel electrophoresis where fragmented DNA was visualized as an

oligonucleosome-sized DNA ladder (Figure 7B). Again, overexpression of procaspase-2S appeared not to significantly influence the appearance of internucleosomal DNA fragmentation.

Overexpression of caspase-2S interferes with activation of caspase-2L. Exposure of U-Neo cells to 50 µM etoposide for 4.5 hours induced the cleavage of the 32 kDa procaspase-3 and the 35 kDa procaspase-7 into their p19/p17 and p10 active fragments, respectively. This treatment also decreased procaspase-2L expression and induced the cleavage of the 116 kDa PARPinto a 85 kDa N-terminal fragment (Figure 8). Meanwhile, no change was observed in the expression of Bcl-2 and Bax, nor in the expression of the 43 kDa actin. Overexpression of wild-type procaspase-2S prevented etoposide-induced decrease of procaspase-2L expression without modifying the changes in the expression of other studied caspases nor preventing PARP cleavage. The C289S mutation in procaspase-2S prevented the ability of the protein to prevent the decrease of procaspase-2L expression observed in etoposide-treated cells (Figure 8). To determine whether procaspase-2S interfered with caspase-2L activation, we measured the ability of whole cell extracts from cells exposed to 50 µM etoposide for various times to cleave the z-VDVAD-AFC substrate. We observed that overexpression of procaspase-2S decreased the VDVAD-AFC cleavage activity induced by etoposide exposure in U937 cells, an effect that was reversed by the C289S mutation (Figure 9).

DISCUSSION

A simple view of the caspase cascade that leads to cell death implicates enzymes with a long prodomain as initiators and those with a short prodomain as effectors of the cell demise. Actually, caspases with a short prodomain can transactivate caspases with a long prodomain, e.g. to realize amplification pathways (Swanton *et al.*, 1999; Slee *et al.*, 1999). In addition, several regulatory mechanisms that include transcriptional regulation of the enzymes (Droin *et al.*, 1998; Kojima *et al.*, 1998; Fujimura *et al.*, 1999), post-translational modifications (Dimmeler *et al.*, 1997; Cardone *et al.*, 1998), sub-

cellular compartmentalization (Colussi *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1999a, Mancini *et al.*, 2000) and interaction with adaptor or inhibitor molecules (for review : Kumar, 1999) modulate the caspase cascade. An additional level of complexity is the existence of alternative spliced isoforms described for several caspases, including caspase-1, -2, -6, -8, -9 and -10 (Cohen, 1997; Srinivasula *et al.*, 1999; Seol and Billiar, 1999; Ng *et al.*, 1999). Some of these isoforms are pro-apoptotic proteins, either due to intrinsic proteolytic activity or the presence of a death effector domain (DED) or a caspase recruitment domain (CARD) involved in the formation of an insoluble filamentous perinuclear structure (Ng *et al.*, 1999). In contrast, other caspase-isoforms are anti-apoptotic, e.g. a short isoform of caspase-9 interacts with the CARD of Apaf-1 and blocks the activation of procaspase-9 and procaspase-3 (Seol and Billiar, 1999; Srinivasula *et al.*, 1999). *CASP-2S* mRNA has been detected in all embryonic and adult tissues examined (Wang *et al.*, 1994). While its overexpression does not induce apoptosis, its ability to prevent cell death remains controversial (Wang *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 1997, Ito *el al.*, 2000). Analysis of caspase-2-deficient mice has identified almost complete resistance of oocytes to apoptosis induced by a chemotherapeutic drug while the death of facial motor neurons was accelerated during mouse development, suggesting that a balance between the two caspase-2 isoforms could modulate its role in apoptosis of specific cell types (Bergeron *et al.*, 1998). Our data indicate that, when overexpressed in leukemic cells, procaspase-2S is an endogenous inhibitor of some specific aspects of apoptosis, including externalization of phosphatidylserine on the plasma membrane, nuclear chromatin condensation and apoptotic body formation.

Zhang *et al.* (1999) recently distinguished a partial condensation of chromatin, that was prevented by overexpressing the anti-apoptotic protein Bcl-2, from a complete condensation of chromatin, associated with the fragmentation of the nucleus, that was prevented by the caspase inhibitor z-DEVD-CH_2F. The morphological features of procaspase-2S overexpressing cells exposed to etoposide suggested that this enzyme mostly delayed the final condensation of the chromatin and the lobulation or fragmentation of the nucleus, also called karyorrhexis. Although partial chromatin

condensation can occur in the absence of caspase activation, e.g. as a consequence of the mitochondrial release of the flavoprotein apoptosis-inducing factor (AIF) (Susin *et al.*, 1999b) or overexpression of the tumor-suppressor gene PML (Quignon *et al.*, 1998), several caspases usually contribute to this apoptotic feature, e.g. through the dismantling of nuclear proteins (Takahashi *et al.*, 1996; Buendia *et al.*, 1999) and the cleavage of Acinus (for apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus) (Sahara *et al.*, 1999). Neither changes in Bcl-2 and Bcl-X_L expression nor inhibition of caspase-3 nor caspase-7 activities could account for the effects of procaspase-2S on chromatin condensation. In contrast, procaspase-2S overexpression partially prevents caspase-2L activation, suggesting that this caspase, which has been localized partly in the nucleus (Colussi *et al.*, 1998), could play a role in initiating the condensation of nuclear chromatin. An alternative hypothesis is that procaspase-2S directly interferes with one or several of the other proteins that have been shown to play a role in chromatin condensation (Zamzami and Kroemer, 1999).

At the end of the death process, apoptotic cells pinch off portions of themselves that contain membrane bound remnants including cellular organelles and chromatin fragments. The formation of apoptotic bodies follows cell shrinkage and membrane blebbing, two consequences of ion efflux (McCarthy and Cotter, 1997). Its molecular mechanisms remain poorly understood, though caspase-3-mediated cleavage of p21-activated kinase 2 (PAK2) (Rudel and Bokoch, 1997), actin / myosin II interactions and the Rho signaling (Mills *et al.*, 1998) were involved in the process. After a 30-hour exposure to 50 µM etoposide, virtually all the control U937 cells were fragmented into apoptotic bodies while a large number of procaspase-2S overexpressing cells were not fragmented, even when the chromatin was highly condensed and the nucleus fragmented. This observation suggests that overexpressed procaspase-2S interferes with the mechanisms involved in the appearance of these cellular corpses, e.g. by preventing the cleavage of a protein required for their formation or altering the mechanisms that control cell shrinkage.

Overexpression of procaspase-2S substantially delayed the exposure of phosphatidylserine at the cell surface in response to etoposide exposure. The

translocation of phosphatidylserine from the inner to the outer leaflet of the cellular plasma membrane is an early sign of apoptosis that also plays a central role in the specific recognition of dead cells by neighboring phagocytes (Fadok *et al.*, 2000). The role of caspases in phosphatidylserine redistribution appears to depends on both the cell type and the stimulus (Rudel and Bokoch, 1997; Woo *et al.*, 1998; Verhoven *et al.*, 1999). Other mechanisms involved in the loss of bilayer asymmetry include enhanced scramblase activity, decreased aminophospholipid translocase activity (Frasch *et al.*, 2000), increased activity of the serine-based exchange enzyme system (Pelassy *et al.*, 2000) and increased calcium influx across the plasma membrane (Verhoven *et al.*, 1999). The protein ISBP (for Ich-1S-binding protein), also known as CIB (for calcium and integrin-binding protein), was recently shown to interact with procaspase-2S (Ito *et al.*, 2000). Whether this protein, that shares homologies with calcineurin B and calmodulin, mediates the effects of procaspase-2S on phosphatidylserine externalization by modulating calcium transport remains to be determined.

Overexpression of procaspase-2S did not demonstrate any influence on the fragmentation of nuclear DNA in oligonucleosome-sized fragments. One of the main nucleases involved in apoptotic DNA degradation is caspase-activated DNase (CAD) (Enari *et al.*, 1998) that is complexed to its chaperone and inhibitor ICAD. In dying cells, ICAD is cleaved by caspases, mainly caspase-3, releasing the inhibition of CAD. CAD may be normally activated in procaspase-2S overexpressing cells, since caspase-3 cleavage is not altered in these cells. Thymocytes from mice in which a cleavage-resistant mutant of ICAD was expressed did not demonstrate DNA cleavage under apoptosis stimuli but exposed phosphatidylserine residues at their plasma membrane, clearly indicating that the two events are independent (McIlroy *et al.*,2000). Our data demonstrate that chromatin condensation can also be partly dissociated from internucleosomal DNA fragmentation and that procaspase-2S only interferes with the former event.

Overexpression of procaspase-2S in U937 cells specifically prevented the activation of caspase-2L without preventing caspase-3 and caspase-7 activation nor modulating the cleavage of PARP. Since caspase-2L was shown to be activated downstream of caspase-3 in a cell-free system (Slee *et*

al., 1999), procaspase-2S could directly interfere with caspase-2L activation, e.g. by competitively inhibiting prodomain-mediated homodimerization of procaspase-2L (Butt *et al.*, 1998) or procaspase-2L / RAIDD interaction (Shearwin-Whyatt *et al.*, 2000). However, procaspase-2S failed to prevent apoptosis induced by overexpression of caspase-2L (Kumar *et al.*, 1997) and recombinant procaspase-2S did not demonstrate any specific inhibitory effect towards caspase-2L in a cell-free system (unpublished data). Alternatively, the inhibitory effect of procaspase-2S could be mediated by the previously described ISBP that interacts with procaspase-2S and partially inhibits the processing of procaspase-2L in a cell-free system (Ito *et al.*, 2000).

The cysteine of the consensus QACXG motif is required for the proteolytic activity of every caspase (Nicholson, 1999). The truncated procaspase-2S, that is devoid of the small subunit, contains a QACRG motif whose function remains unknown. Mutation of the cysteine 289 into a serine was observed to almost completely suppress the ability of procaspase-2S to prevent various features of etoposide-induced apoptosis. This cysteine is not included in the C-terminal, procaspase-2S-specific, 21 amino-acid sequence whose deletion (Δ292-312) prevents procaspase-2S interaction with ISBP (Ito *et al.*, 2000). Thus, other consequences such as modifications of the topology of procaspase-2S (Nicholson, 1999) or its interaction with other cellular proteins might account for the strong influence of this mutation on its biological properties.

Overexpression of the short isoform of procaspase-2 in leukemic cells has impressive consequences on several specific features of apoptosis. More specifically, procaspase-2S prevents complete nuclear disintegration, apoptotic body formation and phosphatidylserine externalization. Thus, procaspase-2S modulates the main events that cause neighboring cells to engulf the dying cells. Apoptotic bodies engulfment prevents the inflammatory response that is associated with necrosis (Ren and Savill, 1998). Processing of phagocytosed apoptotic bodies has been shown also to yield antigens that access the cytosol and the MHC classs I pathway of engulfing cells (Albert *et al.*, 1998), can be recognized by antigen-specific lymphocytes (Ronchetti *et al.*, 1999) and can induce dendritic cell maturation (Rovere *et al.*, 1998). The importance of apoptotic bodies for tumor cell

immunogenicity (Bonnotte *et al.*, 1998; Bonnotte *et al.*, 2000) suggests that the procaspase-2S / procaspase-2L ratio, that is modulated by mammalian splicing factors (Jiang *et al.*, 1998), could determine the quality of a specific antitumor immune response.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr Nicholson (Merck, Toronto, Canada) for kindly providing us an anti-caspase-3 Ab. This work was supported in part by grants from the Medical Research Council of Canada (MT-15019) to RB and grants from the departmental committees (Côte d'Or, Nièvre, Saône et Loire) of the Ligue Nationale Contre le Cancer, the Association pour la Recherche contre le Cancer (# 9567) and the Conseil Régional de Bourgogne to ES. RB is a scholar from the Medical Research Council of Canada and the Cancer Research Society Inc (Canada). ND received supports from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement et de la Recherche, the Société Française d'Hématologie and the French Ministère des Affaires Etrangères.

FOOTNOTES

Abbreviations used : AIF, apoptosis-inducing factor; CAD, caspase-activated DNAse; CARD, caspase recrutment domain; CRADD, caspase and RIP adaptator with death domain; ICAD, inhibitor of CAD; PCR, polymerase chain reaction, RAIDD, RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with a death domain. z-VDVAD-AFC : benzyloxycarbonyl-Valine-Aspartate-Valine-Alanine-Aspartate-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin)

REFERENCES

Ahmad, M., Srinivasula, S.M., Wang, L.J., Talanian, R.V., Litwack, G., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (1997). Cradd, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/Tumor Necrosis factor receptor-interacting protein Rip. Cancer Res. *57*, 615-619.

Albert, M.L., Sauter, B., Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. Nature *392*, 86-89.

Bergeron, L., *et al.* (1998). Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. Genes Dev. *12*, 1304-1314.

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.

Bonnotte, B., Favre, N., Moutet, M., Fromentin, A., Solary, E., Martin, M., Martin, F. (1998). Bcl-2-mediated inhibition of apoptosis prevents immunogenicity and restores tumorigenicity of spontaneously regressive tumors. J. Immunol. *161*, 1433-1438.

Bonnotte, B., Favre, N., Moutet, M., Fromentin, A., Solary, E., Martin, M., Martin, F. Role of tumor cell apoptosis in tumor antigen migration to the draining lymph nodes.J. Immunol. *164*, 1995-2000.

Buendia, B., Santa-Maria, A., and Courvalin, J.C. (1999). Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. J. Cell Sci . *112*, 1743-1753.

Butt, A.J., Harvey, N.L., Parasivam, G., and Kumar, S. (1998). Dimerization and autoprocessing of the Nedd2 (caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxyl-terminal regions. J. Biol. Chem. *273*, 6763-6768.

Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science *282*, 1318-1321.

Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem. J. *326*, 1-16.

Colussi, P.A., Harvey, N.L., and Kumar, S. (1998). Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor. A novel function for a caspase prodomain. J. Biol. Chem. *273*, 24535-24542.

Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M., and Zeiher, A.M. (1997). Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. J. Exp. Med. *185*, 601-607.

Droin, N., Dubrez, L., Eymin, B., Renvoize, C., Breard, J., Dimancheboitrel, M.T., and Solary, E. (1998). Upregulation of Casp genes in human tumor cells undergoing etoposide-induced apoptosis. Oncogene *16*, 2885-2894.

Duan, H., and Dixit, V.M. (1997). Raidd is a new death adaptor molecule. Nature *385*, 86-89.

Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annu. Rev. Biochem. *68*, 383-424.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNAse that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature *391*, 43-50.

Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J. Immunol. *148*, 2207-2216.

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A., and Henson, P.M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. Nature *405*, 85-90.

Frasch, S.C., Henson, P.M., Kailey, J.M., Richter, D.A., Janes, M.S., Fadok, V.A., and Bratton, D.L. (2000). Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by PKC{delta}. J. Biol. Chem.

Fujimura, M., Kasahara, K., Shirasaki, H., Heki, U., Iwasa, K., Ueda, A., and Matsuda, T. (1999). Up-regulation of ICH-1L protein by thromboxane A2 antagonists enhances cisplatin-induced apoptosis in non-small-cell lung-cancer cell lines. J. Cancer Res. Clin. Oncol. *125*, 389-394.

Ito, A., Uehara, T., and Nomura, Y. (2000). Isolation of Ich-1S (caspase-2S)-binding protein that partially inhibits caspase activity. FEBS Lett. *470*, 360-364.

Jiang, Z.H., Zhang, W.J., Rao, Y., and Wu, J.Y. (1998). Regulation of Ich-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. *95*, 9155-9160.

Kojima, M., Asahi, M., Kikuchi, H., Hashimoto, N., Noda, M., and Hoshimaru, M. (1998). Expression of Nedd2/ICH-1 (caspase-2) in the developing rat retina. Neurosci. Res. *31*, 211-217.

Kumar, S., Kinoshita, M., Dorstyn, L., and Noda, M. (1997). Origin, expression and possible functions of two alternatively spliced forms of the mouse Nedd2 mRNA. Cell Death Differ. *4*, 378-387.

Kumar, S. (1999). Mechanisms mediating caspase activation in cell death. Cell Death Differ. *6*, 1060-1066.

Mancini, M., Machamer, C.E., Roy, S., Nicholson, D.W., Thornberry, N.A., Casciola-Rosen, L.A., and Rosen, A. (2000). Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. J. Cell Biol. *149*, 603-612.

McCarthy, J.V., and Cotter, T.G. (1997). Cell shrinkage and apoptosis: a role for potassium and sodium ion efflux. Cell Death Differ. *4*, 756-770.

McIlroy, D., Tanaka, M., Sakahira, H., Fukuyama, H., Suzuki, M., Yamamura, K., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Nagata, S. (2000). An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. Genes Dev. *14*, 549-558.

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.

Mills, J.C., Stone, N.L., Erhardt, J., Pittman, R.N. (1998). Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. J. Cell Biol. *140*, 627-636.

Ng, P.W., Porter, A.G., and Janicke, R.U. (1999). Molecular cloning and characterization of two novel pro-apoptotic isoforms of caspase-10. J. Biol. Chem. *274*, 10301-10308.

Nicholson, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death Differ. *6*, 1028-1042.

Pelassy, C., Breittmayer, J.P., Aussel, C. (2000). Regulation of phosphatidylserine exposure at the cell surface by the serine--base exchange enzyme system during CD95-induced apoptosis. Biochem. Pharmacol. *59*, 855-863.

Quignon, F., De Bels, F., Koken, M., Feunteun, J., Ameisen, J.C., and de The, H. (1998). PML induces a novel caspase-independent death process. Nat. Genet. *20*, 259-265.

Ren, Y., and Savill, J. (1998). Apoptosis: the importance of being eaten. Cell Death Differ. *5*, 563-568.

Ronchetti, A., Rovere, P., Iezzi, G., Galati, G., Heltai, S., Protti, M.P., Garancini, M.P., Manfredi, A.A., Rugarli, C., Bellone, M. (1999). Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. J. Immunol. *163*, 130-136.

Rovere, P., Vallinoto, C., Bondanza, A., Crosti, M.C., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rugarli, C., Manfredi, A.A. (1998). Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. J. Immunol. *161*, 4467-4471.

Rudel, T., and Bokoch, G.M. (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of Pak2. Science *276*, 1571-1574.

Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y., and Tsujimoto, Y. (1999). Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. Nature *401*, 168-173.

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.

Seol, D.W., and Billiar, T.R. (1999). A caspase-9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis. J. Biol. Chem. *274*, 2072-2076.

Shearwin-Whyatt, L.M., Harvey, N.L., and Kumar, S. (2000). Subcellular localization and CARD-dependent oligomerization of the death adaptor RAIDD. Cell Death Differ. *7*, 155-165.

Slee, E.A., *et al.* (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. J. Cell Biol. *144*, 281-292.

Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Guo, Y., Zhan, Y., Lazebnik, Y., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (1999). Identification of an endogenous dominant-negative short isoform of caspase-9 that can regulate apoptosis. Cancer Res. *59*, 999-1002.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P.M., and Kroemer, G. (1999a). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. J. Exp. Med. *189*, 381-393.

Susin, S.A., *et al.* (1999b). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature *397*, 441-446.

Swanton, E., Savory, P., Cosulich, S., Clarke, P., and Woodman, P. (1999). Bcl-2 regulates a caspase-3/caspase-2 apoptotic cascade in cytosolic extracts. Oncogene *18*, 1781-1787.

Takahashi, A., Alnemri, E.S., Lazebnik, Y.A., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Moir, R. D., Goldman, D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H., and Earnshaw, W.C. (1996). Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *93*, 8395-8400.

Van de Craen, M., Declercq, W., Van den brande, I., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1999).The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. Cell Death Differ. *6*, 1117-1124.

Verhoven, B., Krahling, S., Schlegel, R.A., Williamson, P. (1999). Regulation of phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic T lymphocytes. Cell Death Differ. 6, 262-270.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J. Immunol. Methods. *184*, 39-51.

Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H., and Yuan, J. (1994). Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. Cell. *78*, 739-750.

Woo, M., *et al.* (1998). Essential contribution of caspase 3 Cpp32 to apoptosis and its associated nuclear changes. Genes Devel. *12*, 806-819.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol. *68*, 251-306.

Zamzami, N., and Kroemer, G. (1999). Condensed matter in cell death. Nature *401*, 127-128.

Zhang, J.D., Reedy, M.C., Hannun, Y.A. and Obeid, L.M. (1999). Inhibition of caspases inhibits the release of apoptotic bodies: Bcl-2 inhibits the initiation of formation of apoptotic bodies in chemotherapeutic agent-induced apoptosis. J. Cell. Biol. *145*, 99-108.

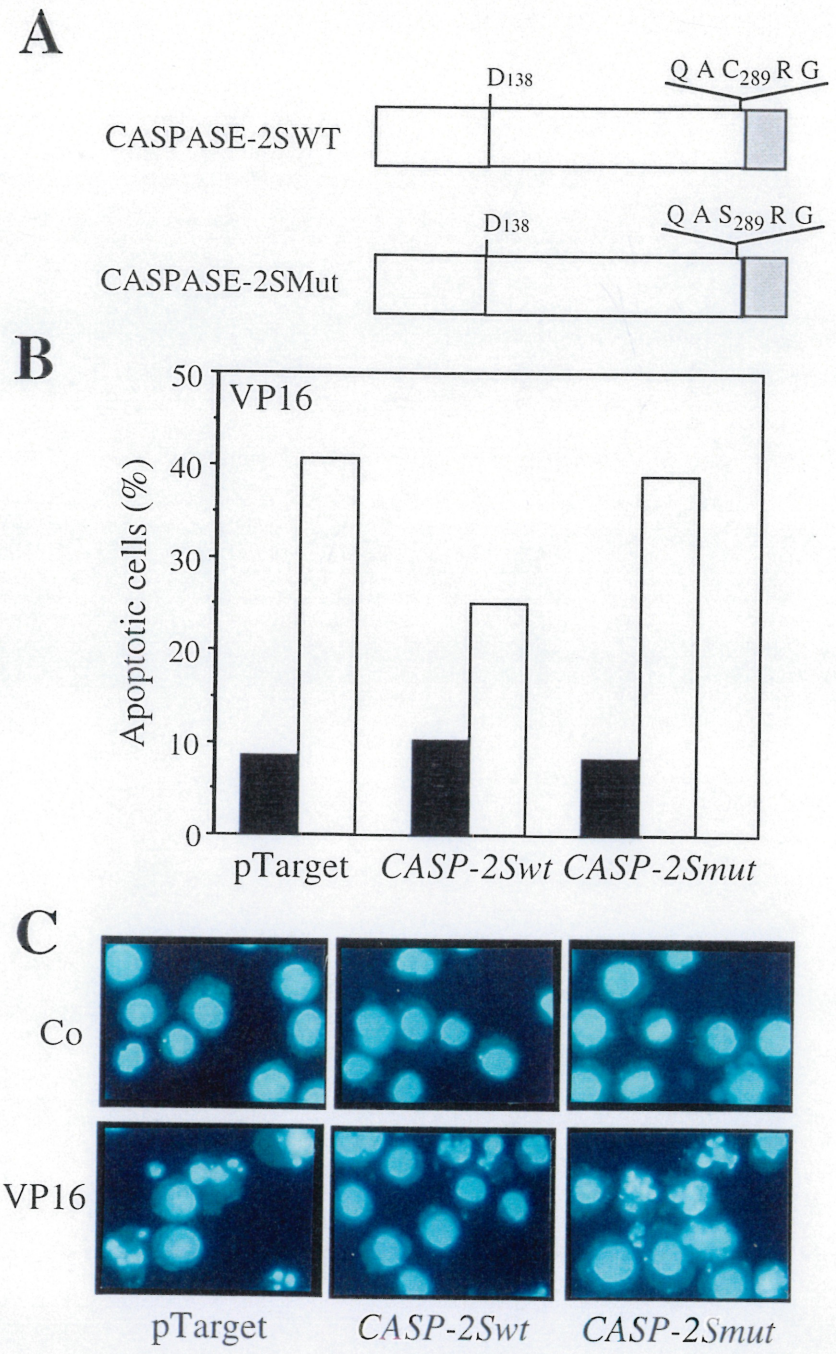


***Figure 1*. Role of procaspase-2S in etoposide-induced apoptosis.**

A) U937 cells were transiently transfected with wild-type and mutated cDNAs cloned in pTarget vector, in combination with a GFP-expressing vector. B) Percentages of GFP-positive apoptotic cells induced by exposure to 50 µM etoposide for 5 h. The nuclear features of apoptosis (chromatin condensation and nuclear fragmentation) were identified by staining nuclear chromatin with Hoechst 33342. Black bars : untreated cells. White bars : treated cells. One representative of three experiments is shown. C) Hoescht 33342 staining of cells transfected with indicated vectors, either untreated (Co) or treated with 50 µM etoposide (VP16) for 5 h.

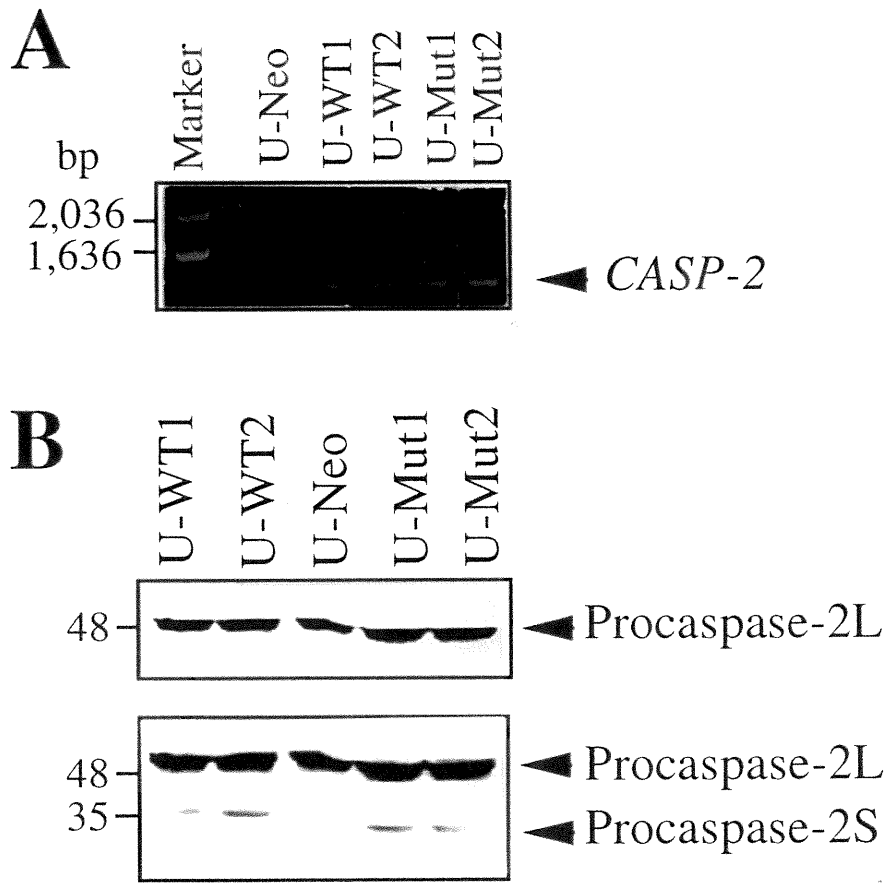


***Figure 2*. Characterization of U937 cells stably transfected with *CASP-2S* expressing vector.**

U-Neo and U-WT1 cells are two U937 clones transfected with empty and *CASP-2S* expressing pTarget vector, respectively. U-WT2 cells, U-Mut1 and U-Mut2 are mixed population of U937 cells stably transfected with the wild type (U-WT2) and C289S mutated (U-Mut) *CASP-2S* construct, respectively. A) PCR analysis of genomic DNA showing pTarget-*CASP-2S* insertion in transfected cells; B) Western blot analysis of procaspase-2L and -2S expression in transfected cells.

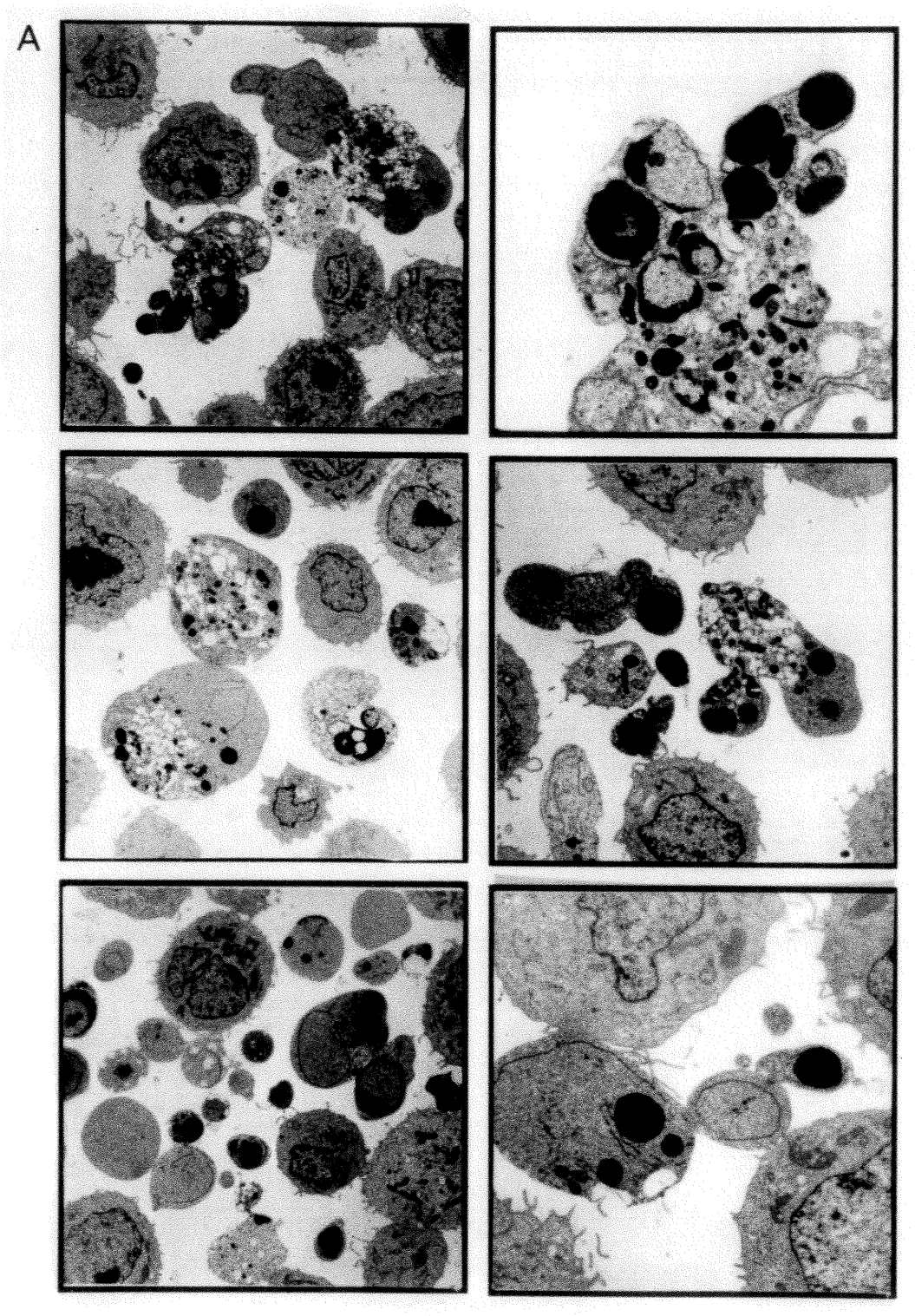


Figure 3 . **Influence of procaspase-2S overexpression on the ultrastructural morphology of U937 cells exposed to etoposide.**

U-Neo (A), U-WT1 (B) and U-Mut2 (C) cells were treated for 5 h with 50 µM etoposide before lead citrate staining and examination with a Ziess Em 10 CA microscope (Magnification - left columns A,B,C : x 1500; right columns : A top x 4725; middle x 2360; bottom x 3750; B top x 2360; middle & bottom x 3750; C top x 4725, middle & bottom: x 6000). A) U-Neo cells demonstrate cell shrinkage, highly condensed chromatin, numerous vesicles in their cytoplasm and apoptotic bodies in the extracellular space.

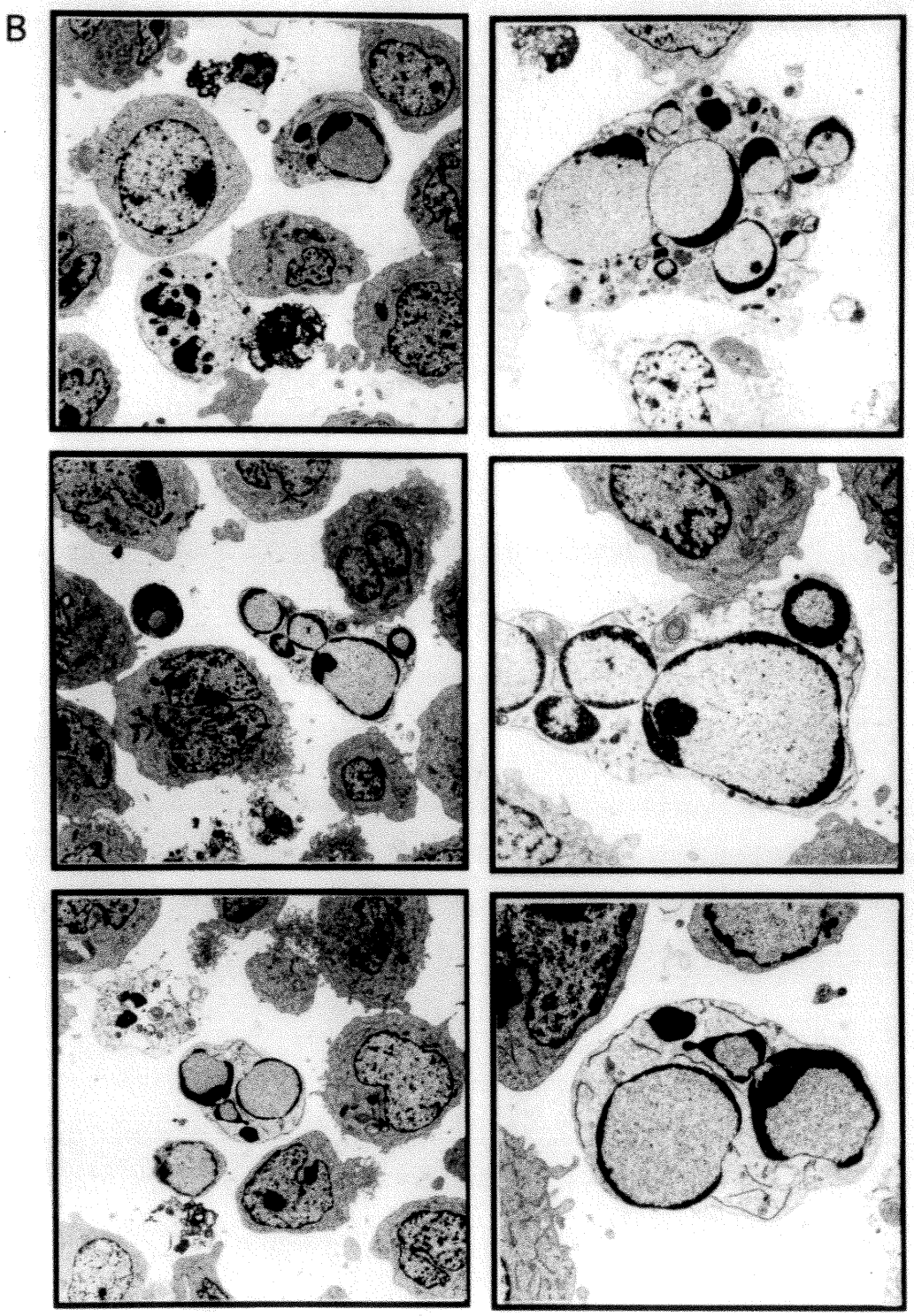


Figure 3 . **Influence of procaspase-2S overexpression on the ultrastructural morphology of U937 cells exposed to etoposide.**

B) In U-WT1 cells, chromatin condensation is around the envelope of lobulated or fragmented nuclei, the cytoplasm contains much less vesicles and very few apoptotic bodies are observed.

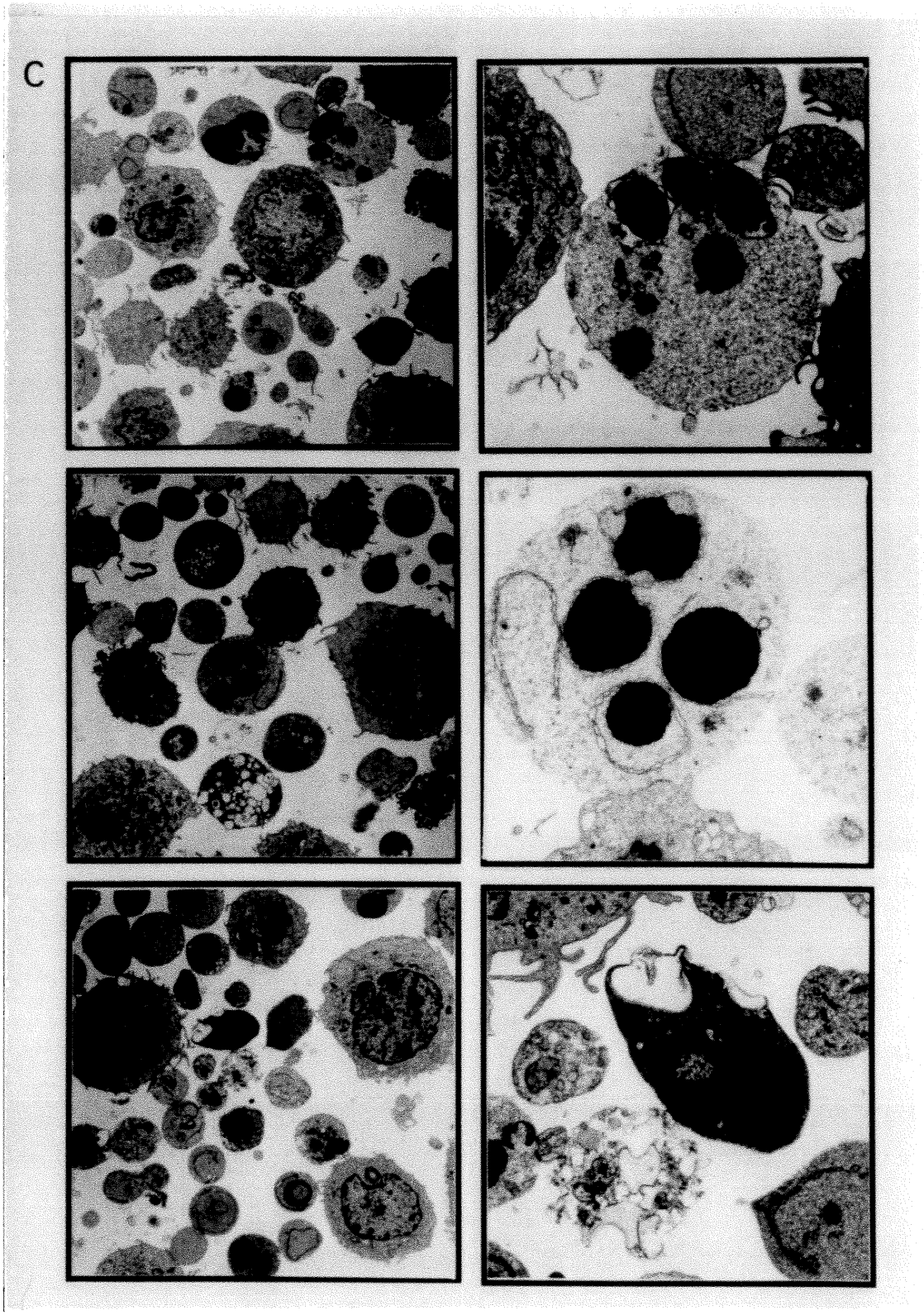


Figure 3 . **Influence of procaspase-2S overexpression on the ultrastructural morphology of U937 cells exposed to etoposide.**

C) The C289S mutation suppresses the ability of caspase-2S to negatively interfere with the appearance of the morphological features of apoptosis.

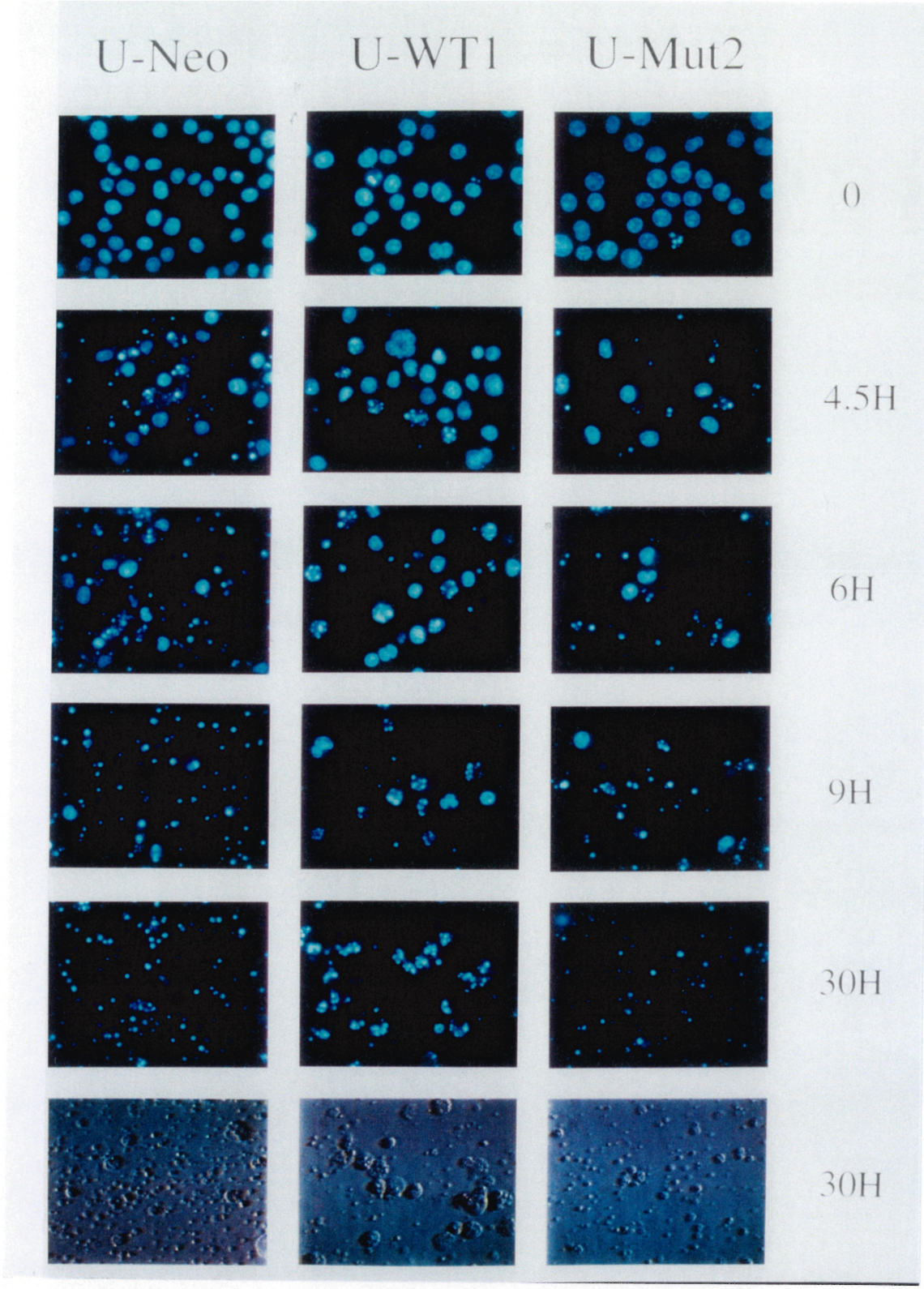


Figure 4 . **Procaspase-2S overexpression modulates apoptosis related-morphological changes.**

U-Neo, U-WT1 and U-Mut2 cells were treated for indicated times with 50 µM etoposide (VP16). Then, the nuclear chromatin was stained with Hoechst 33342 for 30 min at 37°C and morphological changes were examined by fluorescence and phase contrast microscopy (Magnification : x 40). Similar results were obtained by testing U-WT2 and U-Mut1 cells.

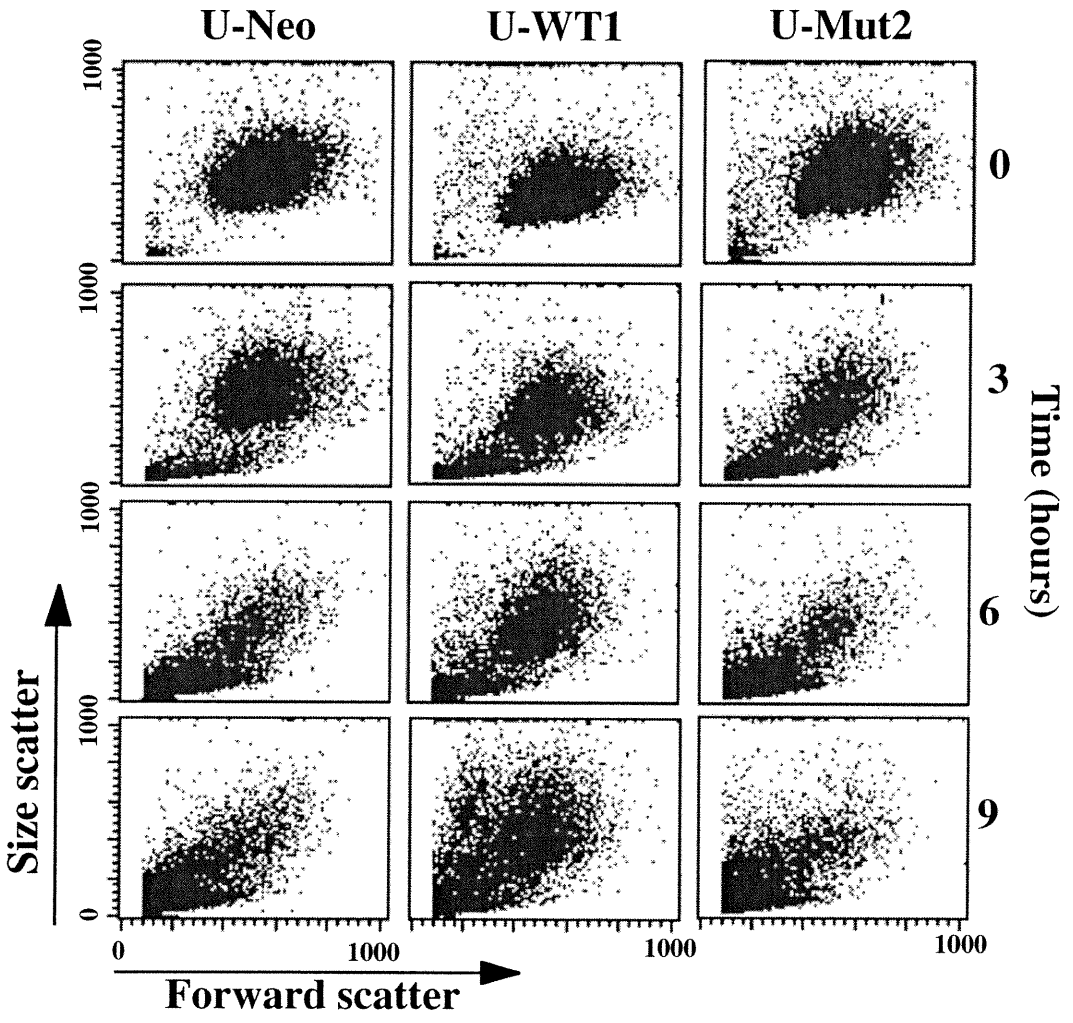


Figure 5 . **Procaspase-2S overexpression prevents U937 cell shrinkage induced by etoposide exposure.**

U-Neo, U-WT1 and U-Mut2 cells were treated for indicated times with 50 μM etoposide (VP16). Then, the forward and size scatters were determined by flow cytometry. Similar results were obtained by testing U-WT2 and U-Mut1 cells.

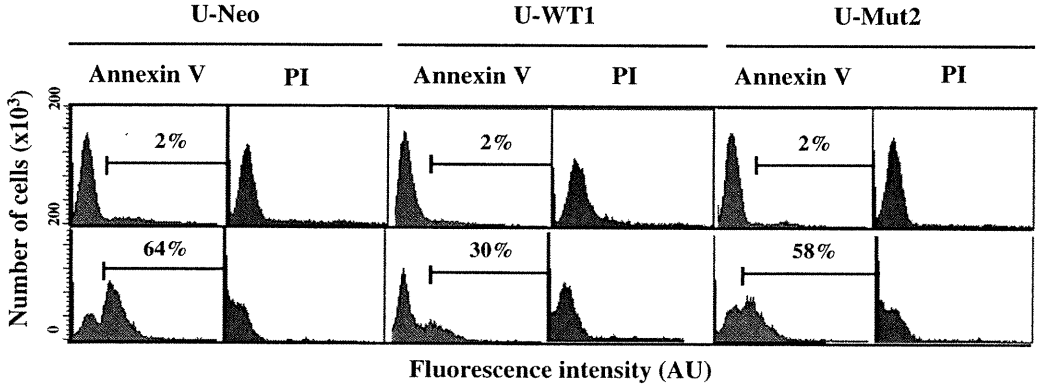


Figure 6 . **Procaspase-2S overexpression delays phosphatidylserine externalization on the plasma membrane of etoposide-treated cells.**

Flow cytometry analysis of Annexin V- and propidium iodide (PI)-labeled U-Neo, U-WT1 and U-Mut2 cells treated for 4 hours with 50 μM etoposide. Percentages of cells labeled with annexin V are indicated. The percentage of cells labeled with PI did not exceed 15 %. One representative of five different experiments is shown. Similar results were obtained by testing U-WT2 and U-Mut1 cells.

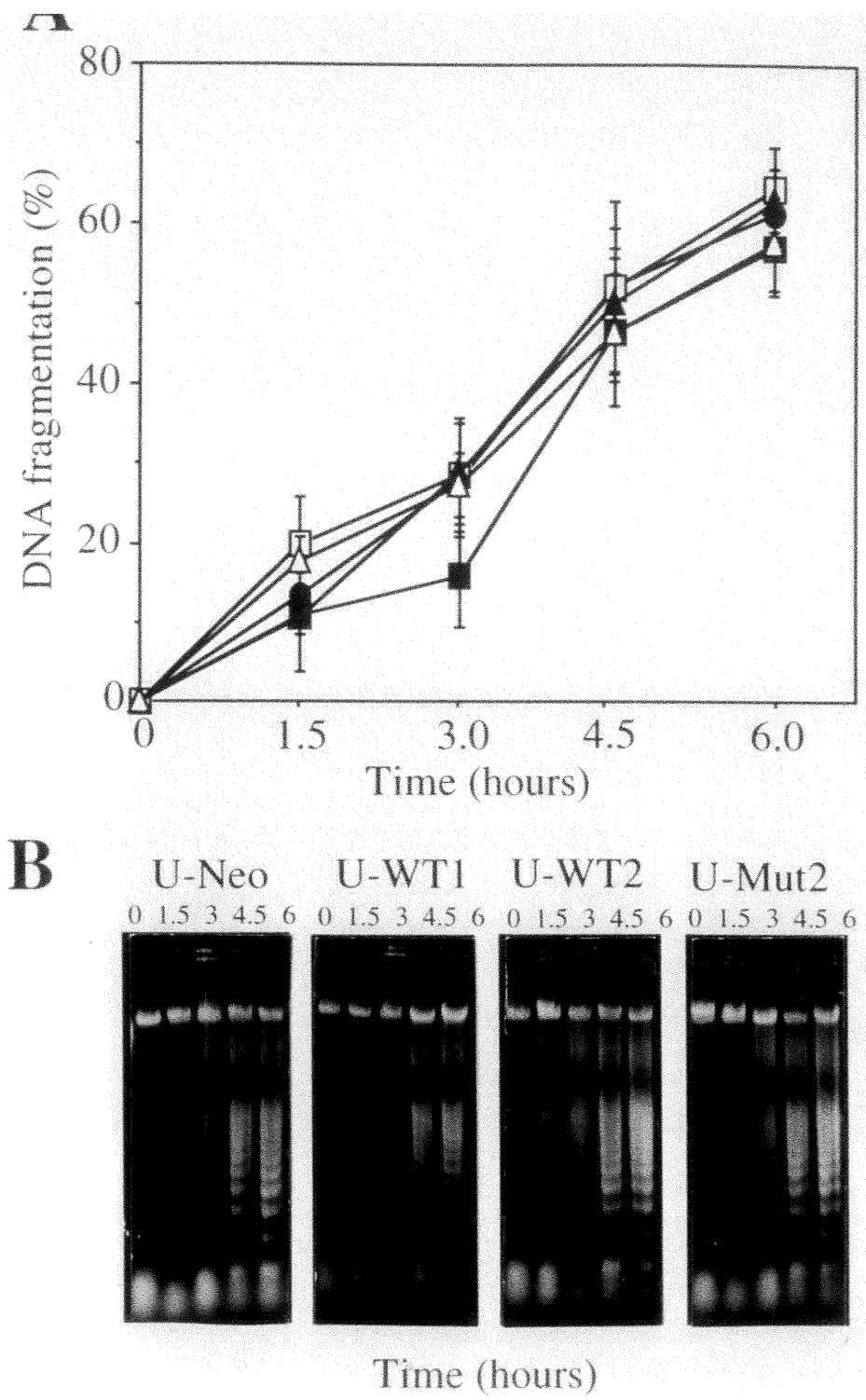


Figure 7. **Procaspase-2S overexpression does not affect DNA fragmentation in etoposide-treated cells.**

A) Kinetics of DNA fragmentation was monitored by a DNA filter elution assay in U-Neo (●), U-WT1 (■), U-WT2 (□), U-Mut1 (△) and U-Mut2 (▲) cells treated for indicated times with 50 mM etoposide. Results at each time points are expressed as percentage of DNA fragmentation measured in control cells. Bars represent the mean ± SE of two series of experiments realized in triplicate. B) Agarose gel electrophoresis of DNA obtained from etoposide-treated U-Neo, U-WT1, U-WT2 and U-Mut2 cells.

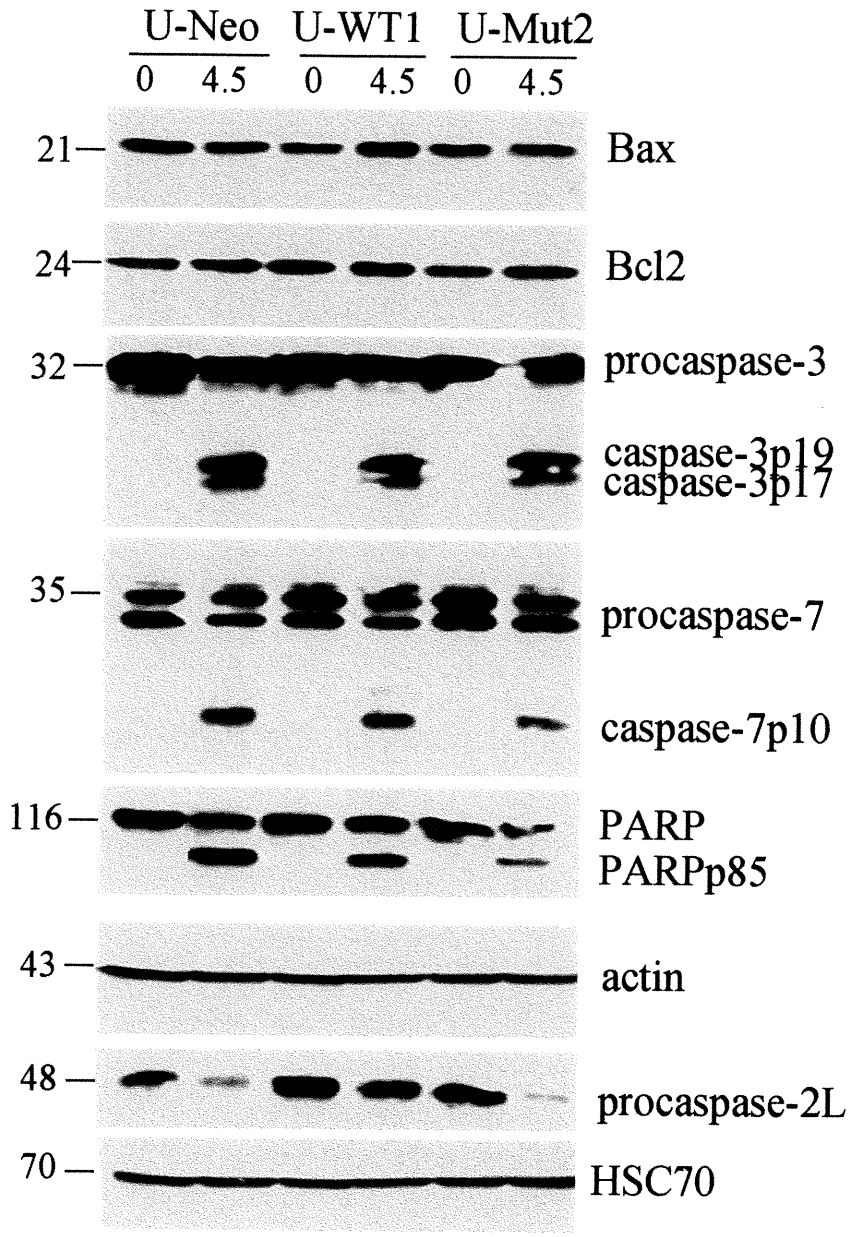


Figure 8 . **Etoposide-induced changes in the expression of various cellular proteins.**

U-Neo, U-WT1 and U-Mut2 cells were treated for 4.5 h with 50 μM etoposide before analyzing the expression of indicated proteins by immunoblot. HSC70 expression was used as a control for protein loading. One representative of three different experiments is shown.

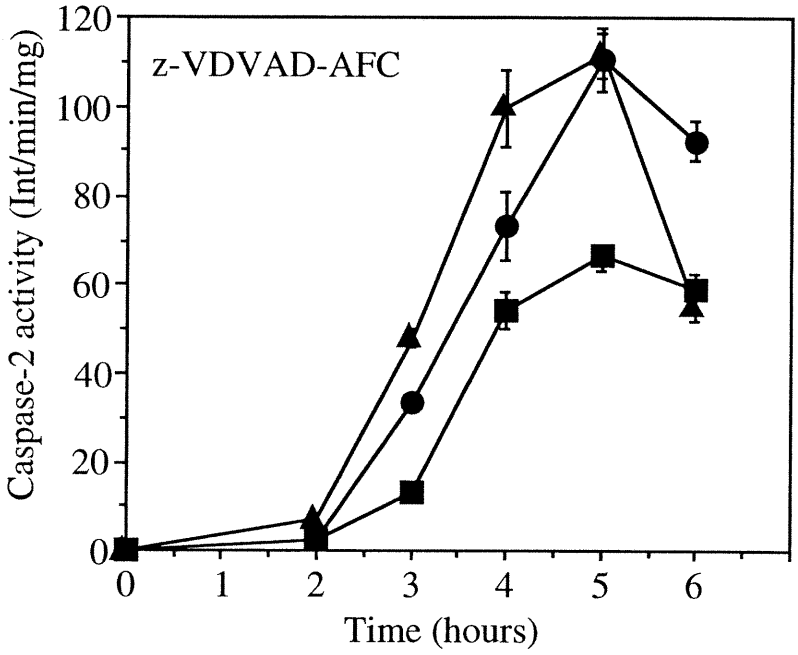


Figure 9 **. Kinetics of caspase-2L activity after etoposide treatment.**

Kinetics of z-VDVAD-AFC (caspase-2L substrate) hydrolysis was monitored in U-Neo (●), U-WT1 (■) and U-Mut2 (▲) cells treated for indicated times with 50 μM etoposide. Initial velocities were monitored and results were expressed as enzyme activity in treated cells relative to control. The results of one representative of two independent experiments are shown.

TABLE I. Percentage of apoptotic cells after etoposide-treatment

	U-Neo (%)	U-WT1 (%)	U-WT2 (%)	U-Mut1 (%)	U-Mut2 (%)
0	3.6 +/- 0.47	3.6 +/- 1.24	2.6 +/- 0.94	3.6 +/- 1.24	3 +/- 0.81
3h	32 +/- 0.81	20.3 +/- 1.24	24.3 +/- 1.24	31.3 +/- 1.88	32.6 +/- 1.24
4.5h	46.6 +/- 1.24	29 +/- 0.81	34.6 +/- 0.47	46 +/- 2.16	47.3 +/- 1.69
6h	65 +/- 1.63	39.6 +/- 0.47	50 +/- 1.6	65.6 +/- 2.6	67 +/- 1.63
9h	85.3 +/- 0.94	67 +/- 1.63	74.3 +/- 1.69	86.3 +/- 2.62	87.3 +/-1.24

The five cell populations were treated with 50 μM etoposide for indicated times. Apoptotic cells were identified by fluorescence microscopy after staining nuclear chromatin with Hoescht 33342. Each percentage is the mean +/- SD of 3 experiments with 300 cells counted at each time-point.

4.2 - Etude des procaspases-2S et -2S mutée dans un système acellulaire.

Afin de déterminer le mécanisme d'action de la procaspase-2S, nous avons produit la procaspase-2S et la procaspase-2S mutée recombinantes en utilisant le vecteur d'expression procaryote pET-30b. Après avoir optimisé la concentration d'ITPG ainsi que la température et le temps d'incubation, nous avons extrait et purifié sur colonne de nickel nos différentes protéines recombinantes. En utilisant un système acellulaire dans lequel les caspases sont activées par le cytochrome c et le dATP ou par le granzyme B, nous avons montré que des quantités croissantes de procaspase-2S recombinante purifiée inhibaient de manière dose-dépendante l'activité enzymatique des caspases-9, -6, -2L ou des caspases s'apparentant à la caspase-3 (Figure 23 A et C). Dans ce même système, des quantités croissantes de procaspase-2S mutée recombinante purifiée inhibent l'activité enzymatique des caspases-9, -6 ou des caspases s'apparentant à la caspase-3. Cependant, en présence de quantité croissante de procaspase-2S mutée recombinante, on observe que l'activité enzymatique de la caspase-2L n'est pas (cytochrome c en présence de dATP) ou partiellement (granzyme B) inhibée (Figure 23 B et D).

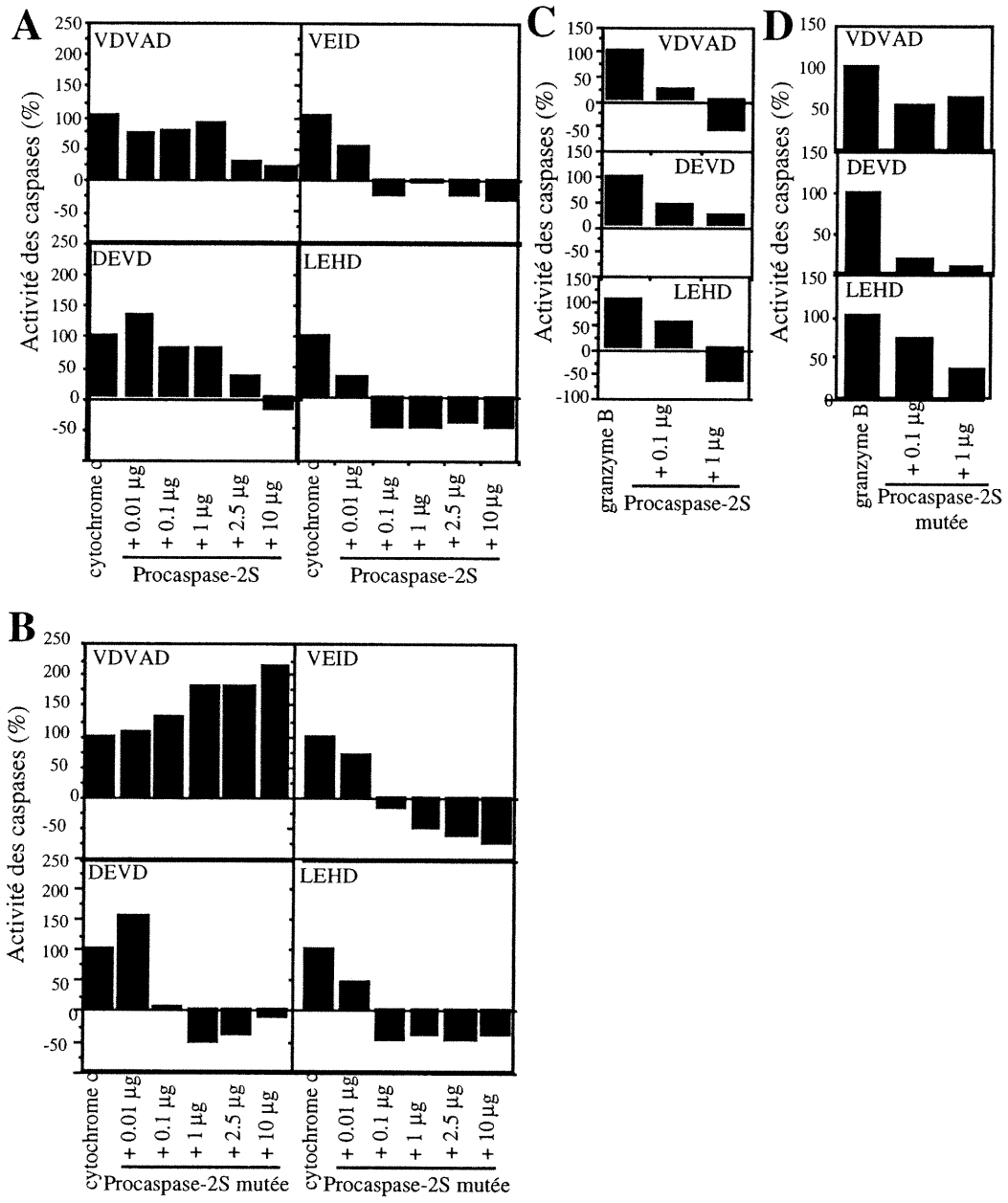


Figure 23: Etude de la procaspase-2S et de la procaspase-2S mutée sur l'activité de différentes caspases dans un système acellulaire. Des extraits totaux de cellules U937 ont été traités par 5 µM de cytochrome c avec 1 mM de dATP (A & B) ou avec 5 ng/ml de granzyme B (C & D) en présence de quantité croissante de procaspase-2S recombinante (A & C) ou de procaspase-2S mutée recombinante (B & D). L'activité des caspases-9 (LEHD), -3-like (DEVD), -2L (VDVAD) et -6 (VEID) a été ensuite mesurée.

CHAPITRE 5 Identification et caractérisation d'une nouvelle isoforme de la procaspase-2

5.1 - Mise en évidence de cette nouvelle isoforme

Au cours de la mise au point de la technique de RT-PCR pour les messagers *CASP-2L* et *CASP-2S*, des bandes supplémentaires de taille inattendue ont été observées (Figure 27). La spécificité de ces bandes a été démontrée par hybridation avec des oligonucléotides de 30 mers communs aux deux isoformes connues de la procaspase-2. Tout comme les messagers *CASP-2L* et *CASP-2S*, cette nouvelle isoforme est exprimée de façon hétérogène d'une lignée leucémique humaine à l'autre (Figure 24 A). Son expression augmente au cours d'un traitement continu par 50 µM d'étoposide dans les lignées leucémiques HL-60 (Figure 24 B) et U937 (Figure 24 C).

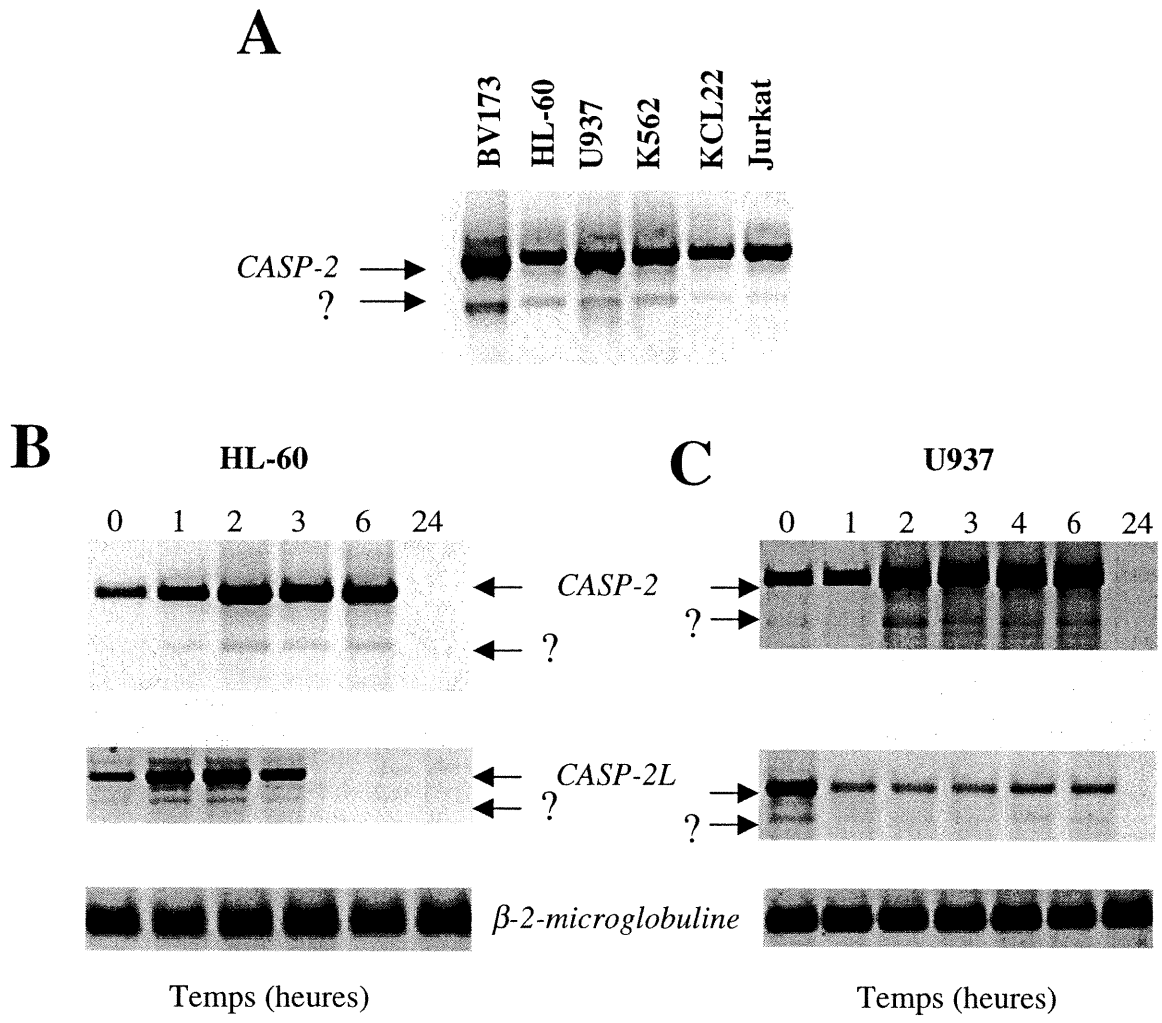


Figure 24: Identification d 'une nouvelle isoforme de la procaspase-2. L'expression de différents messagers *CASP* a été étudiée par RT-PCR dans différentes lignées leucémiques humaines traitées ou non par 50 µM l 'étoposide. A) Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d 'amplification *CASP-2* colorés au bromure d 'éthidium dans les lignées leucémiques humaines BV173, HL60, U937, K562, KCL22 et Jurkat. Le point d 'interogation désigne une bande qui est hybridée avec une sonde spécifique de CASP-2. Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification *CASP-2* et *CASP-2L* colorés au bromure d 'éthidium dans les lignées HL60 (B) et U937 (C) traitées par l 'étoposide pendant les temps indiqués. La *β-2-microglobuline* est utilisée comme un contrôle interne. Le point d 'interogation désigne une bande qui est hybridée avec une sonde spécifique de CASP-2.

5.2 - Identification of a caspase-2 isoform that behaves as an endogenous inhibitor of the caspase cascade (soumis à publication)

Nous avons isolé et séquencé ces ADNc de taille inattendue. Nous avons mis en évidence une nouvelle isoforme de la procaspase-2 avec une délétion de 218 paires de bases que nous avons dénommé caspase-2L-Pro. Cette nouvelle isoforme code pour une partie du prodomaine de la procaspase-2L, à savoir le domaine CARD délété de la sixième hélice alpha. Elle est exprimée de façon hétérogène d'un tissu sain à l'autre, d'une lignée à l'autre.

Par le système double hybride chez la levure, nous avons montré que la caspase-2L-Pro pouvait interagir avec la procaspase-2L et avec RAIDD, une molécule adaptatrice de la voie de signalisation du TNF, mais n'interagissait ni avec FADD, ni avec Apaf-1. Des expériences d'immunoprécipitation ont permis de confirmer ces résultats.

En utilisant le système acellulaire précédemment décrit, dans lequel les caspases sont activées par l'ajout de 50 µg/ml cytochrome c en présence de 1 mM de dATP, nous avons observé que des quantités croissantes de caspase-2L-Pro recombinante purifiée inhibaient de façon dose-dépendante l'activité des caspases-9, -6, -2L et de celles s'apparentant à la caspase-3, suggérant que la nouvelle isoforme interfère avec l'activité de différentes caspases.

Il avait été montré que les mutations F80A/D83A du prodomaine chimère de la procaspase-2L empêchaient l'interaction de cette construction avec RAIDD (Duan & Dixit, 1997). Nous les avons reproduites par mutagenèse dirigé. La nouvelle isoforme, caspase-2L-Pro, et le mutant ont été clonés dans le vecteur d'expression pTarget et transfectés de manière transitoire dans la lignée leucémique humaine Namalwa. La surexpression de la caspase-2L-Pro induit faiblement de l'apoptose. Nous avons pu sélectionner une population stable pour chaque transfection.

La surexpression de la caspase-2L-Pro retarde l'apoptose induite par l'étoposide, par la camptothécine, par un anticorps agoniste de Fas et par le TNF-alpha alors que la surexpression du mutant n'a aucun effet sur l'apoptose induite par ces différents stimuli. La surexpression de la caspase-2L-Pro interfère avec l'activité des caspases-9, -6, -2L et de celles s'apparentant à la caspase-3 au cours d'un traitement par l'étoposide. La mutation F80A/D83A supprime cet effet inhibiteur de caspase-2L-Pro, suugérant que des interactions du type de celles observées entre le prodomaine de la procaspase-2 et RAIDD sont nécessaires à l'effet inhibiteur de la caspase-2L-Pro.

Identification of a caspase-2 isoform that behaves as an endogenous inhibitor of the caspase cascade

Inhibition of apoptosis by caspase-2L-Pro

Nathalie Droin[1,2], Myriam Beauchemin[1], Eric Solary[2], Richard Bertrand[1,3]

[1] Research Centre of the University of Montreal Hospital Centre, Notre Dame Hospital, Montreal Cancer Institute, Montreal (Que.) Canada and [2] INSERM U517, Faculty of Medicine and Pharmacy, 21033 Dijon, France

Myriam Beauchemin a participe au clonage des différentes constructions pour le double hybride et a mis au point cette technique.

ABSTRACT

Procaspase-2 is one of the aspartate-specific cysteine proteases that are activated in response to various apoptotic stimuli. Two isoforms of human procaspase-2 have been initially described. Overexpression of the long isoform (caspase-2L) promotes cell death while the short isoform (caspase-2S) antagonizes some apoptotic pathways. In the present study, we identified 2 additional *CASP-2* mRNAs designated *CASP-2L-Pro* and *CASP-2S-Pro*. The proteins encoded by these isoforms corresponded to the prodomain of procaspase-2L and –2S in which the last alpha-helix of their caspase recruitment domains was deleted. Caspase-2L-Pro mRNA and protein were detected in a series of human tissues and cell lines. Yeast 2-hybrid assays and immunoprecipitation studies indicated that caspase-2L-Pro can interact with procaspase-2L and the adaptor protein RAIDD/CRADD, but not with FADD/MORT1 or APAF-1 adaptor proteins. The addition of recombinant caspase-2L-Pro negatively interfered with cytochrome c/ dATP-mediated activation of the caspase cascade in a cell-free system. In transient expression studies of human B lymphoma Namalwa cells, overexpression of caspase-2L-Pro weakly induced apoptosis which was prevented by a D83A/E87A double mutation. In stable selected *CASP-2L-Pro*-transfected Namalwa cells, overexpression of caspase-2L-Pro delayed apoptotic DNA fragmentation induced by death receptor agonists (anti-Fas antibodies, TNF-a), DNA topoisomerase I (camptothecin) and II (etoposide) inhibitors, and prevented etoposide-induced activation of the caspase cascade. These inhibitory effects were not observed in stable transfected cells expressing the D83A/E87A double mutant. Altogether, these data indicated that caspase-2L-Pro isoform functions as an endogenous apoptosis inhibitory protein that antagonizes caspase activation and cell death.

INTRODUCTION

The evolutionary conserved process known as apoptosis plays an essential role in normal development, tissue homeostasis and immune responses while its dysregulation is involved in the pathogenesis of various diseases (1-4). Apoptosis is also one of the cell death mechanisms that can be triggered in cancer cells by cytotoxic drugs (5-7). This death process usually requires the activation of a series of cysteine aspartate-specific proteases referred to as caspases (8). These enzymes are produced as zymogens, known as procaspases, that require proteolytic cleavage to constitute a catalytically active endopeptidase (9-11). Fully mature caspases are heterotetramers that contain 2 large and 2 small subunits. In addition to the 4 subunits that constitute the active enzyme, procaspases contain an amino-terminal prodomain of varying length (12). The caspase gene family contains 14 mammalian enzymes, of which 11 have been cloned in humans (11). Some of these enzymes (caspase-1, -4, -5, -11) are involved mainly in cytokine processing. Other caspases can be subdivided in 2 groups on the basis of their prodomain length. A simple view of the proteolytic cascade activated during apoptosis involves caspases with a long prodomain (caspase-8, -9, -10) as initiator enzymes that cleave and activate effector caspases with a short prodomain (caspase-3, -6, -7). In turn, these latter enzymes cleave a series of key cellular proteins which results in cell dismantling. Actually, *in vitro* studies have shown that effector caspases can cleave and activate caspases with a long prodomain, suggesting feedback amplification loops (13).

Activation of initiator caspases requires adaptor molecules that interact with their prodomains. These prodomains contain either a death effector domain (DED) or a caspase recruitment domain (CARD). Both DED and CARD function as interaction motifs that allow specific protein-protein interaction. Interaction between CARDs in the adaptor molecule APAF-1 and in the prodomain of procaspase-9 mediates the recruitment, oligomerization and activation of the enzyme that, in turn, activates effector caspases such as caspase-3 and -7 (14-17). Similarly, interaction between DEDs in the adaptor FADD/MORT1 and the prodomain of procaspase-8 mediates the recruitment of the enzyme in a death-initiating signaling complex.

FADD/MORT1 contains another protein-protein interaction domain known as the death domain (DD), also found in the carboxyterminal intracytoplasmic part of plasma membrane death receptors. Interaction between DDs follows ligand-dependent receptor activation (18-23). All these interaction domains have a similar 3-dimensional structure consisting of 6 or 7 α-helices organized in an antiparallel arrangement (24-26).

Human procaspase-2L, initially described as Ich-1L (27), is a long prodomain-containing enzyme that is activated in many cell types in response to various apoptotic stimuli, including growth factor withdrawal, DNA damaging agents, tumor necrosis factor α (TNF-α) and Fas ligation (27-31). The role of caspase-2L in the proteolytic cascade that leads to cell death remains poorly understood. The caspase-2L prodomain contains a CARD that interacts with a similar domain of the adaptor molecule RAIDD/CRADD (29, 32). This latter molecule also contains a DD that can associate with the DD of the serine/threonine kinase RIP (32), an enzyme that interacts with the TNF receptor-1 (TNFR-1) via TRADD (33). RAIDD/CRADD was proposed to recruit procaspase-2L to TNFR-1 in a manner similar to the recruitment of procaspase-8 to the Fas death receptor via FADD/MORT1 (29, 32). However, while disruption of the *CASP-8* gene in mice completely abolishes TNF-α-induced cell death, *CASP-2* null mice do not exhibit any significant defect in TNF-α mediated apoptosis, suggesting that caspase-2L does not play a key role as an initiator enzyme in this cell death pathway (34, 35). In addition to its recruitment at TNFR-1, procaspase-2L has been shown to be released from mitochondria upon apoptotic stimulation, accumulating in the nucleus in which the protein colocalizes with RAIDD to subnuclear dot-like and filamentous structures, and migrating to the Golgi apparatus where it specifically cleaves golgin-160 (36-39). In a cell-free system established to reconstitute the proteolytic cascade activated by cytochrome c released from the mitochondria upon apoptotic stimuli, procaspase-2L was found to be cleaved by effector caspases such as caspase-3, suggesting its possible downstream involvement in the cascade (40).

While overexpression of procaspase-2L induces apoptosis in various cell types, a truncated isoform has been initially described whose

overexpression prevents the death of cells deprived of growth factors (27). Alternative splicing of *CASP* gene mRNA has been identified for several other caspases, including caspase-1, -6, -7, -8, -9 and -10 (22, 23, 41-47). Ectopic transient overexpression of some of these isoforms demonstrated pro-apoptotic activity, either due to intrinsic proteolytic activity or the presence of a DED or a CARD involved in either the recruitment and autoprocessing of procaspases (10) or the formation of insoluble filamentous structures termed death effector filaments (36, 48). Conversely, overexpression of alternative spliced isoforms of *CASP-9* gene, that encode procaspase-9b, inhibits the activation of procaspase-9 by competitively interacting with the CARD of APAF-1 (46, 47) while caspase-8α3 impedes Fas- and TNFR-1-induced cell death (23).

Here, we report the identification of 2 additional isoforms of *CASP-2* gene. These isoforms encode proteins designated caspase-2L-Pro and caspase-2S-Pro, since they correspond to caspase-2L and caspase-2S prodomain lacking the last α-helix of their CARD domains. We focused on caspase-2L-Pro that is shown to function as an endogenous apoptosis inhibitory molecule by interfering with procaspase-2L activation and the proteolytic cascade.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and culture. All cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and grown in suspension culture in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin in an atmosphere of 95% air and 5% CO_2 at 37°C. Cell culture products were purchased from Gibco-BRL Life Technologies (Grand Island, NY). To ensure exponential growth, the cells were resuspended in fresh medium 24 h before each treatment. For DNA labeling, they were grown with [^{14}C]-thymidine (0.03 μCi/ml) for 24 h, then chased overnight in isotope-free medium prior to drug treatment.

Drugs and chemicals. Radioactive precursors [α-^{32}P]-dCTP (> 3,000

Ci/mmol) and [2-^{14}C]-thymidine (59 μCi/mmol) were procured from ICN BioMedicals (Costa Mesa, CA). Etoposide (VP16), 20S-camptothecin lactone (CPT), cycloheximide and recombinant TNF-α were purchased from the Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and stock solutions made in dimethylsulfoxide were stored at -80°C. The agonist anti-human Fas mAb (IgM, clone CH-11) was obtained from Upstate Biotechnologies (Lake Placid, NY). The specific fluorogenic derivative peptides acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC), acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-LEHD-AFC), acetyl-Val-Glu-Ile-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-VEID-AFC), benzyloxycarbonyl-Val-Asp-Val-Ala-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (z-VDVAD-AFC) and 7-methoxycoumarin-4yl-acetyl-Val-Asp-Val-Ala-Asp-Gly-Trp-Lys-dinitrophenol-NH2 (MCA-VDVADGWK(DNP)-NH2) were acquired from Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA) and Calbiochem-Novobiochem Corporation (San Diego, CA). All other chemicals were of reagent grade and purchased either from Sigma, ICN BioMedicals, Roche Molecular Biochemicals (Montreal, Que.) or other local sources.

cDNA cloning, site-directed mutagenesis and transfection. Human *CASP-2L-Pro* and *CASP-2S-Pro* cDNAs were first cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from mRNA using *CASP-2L-* and *CASP-2S*-specific adaptor primers containing *Not I* sequences at their respective ATG start and TGA stop codons. All amplified fragments were directly cloned into pTarget vector (Promega, Charbonnières, France) and sequenced according to the manufacturer's instructions (Pharmacia Biotech, Orsay, France). The open reading frame of *CASP-2L-Pro* cDNA was subcloned into pTarget vector by PCR with *CASP-2L-Pro*-specific primers, PRO sense primer encoding an HA epitope tag sequences (5'-ATGTATCC TTATGATGTTCCTGATTATGCTGCCGCTGACAGGGGACGCAGG-3') and PRO antisense primer sequences (5'-TCAGGAGTGCAAGGCTTCACAGAA GGCATCAAAAG CTTGGGG-3'). *CASP-2L-Pro* site-directed mutagenesis was performed on the pTarget-*HA-CASP-2L-Pro* plasmid, using primer PRO sense and primer MUT-2L antisense (5'-TCAGGAGTGCAAGGCTGCAC

AGAAGGCAGCAAAAGCTTGGGG-3') containing the mutations. The pTarget-*His-CASP-2L* vector was generated by PCR using the *CASP-2L*-specific primers, with the sense primer encoding His repeated sequences. The pCDNA3-*FLAG-RAIDD* vector was obtained from Dr. V.M. Dixit (University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI).

In transient expression experiments, all transfections were performed by electroporation at 270 volts (Gene Pulser, Biorad, Hercules, CA) with 10 μg of each vector and the cells were incubated for 48 h at 37°C before analysis. To generate stable transfected cell populations, $10x10^6$ Namalwa cells were electroporated at 270 volts with 10 μg of each plasmid, including empty pTarget vector or pTarget encoding *HA-CASP-2L-Pro or HA-CASP-2L-ProMut*. The electroporated Namalwa cells were selected during 2 months in RPMI-1640 media supplemented with 10% fetal calf serum and 2 mM L-glutamine in the presence of 1.5 mg/ml G418.

***In vitro* transcription/translation experiments and production of recombinant caspase-2L-Pro protein**. In *in vitro* transcription/translation studies, procaspase-2L, procaspase-2S and caspase-2L-Pro proteins were generated by TNT-coupled transcription/translation assay, according to the manufacturer's instructions (Promega) with purified pTarget-*CASP-2L*, pTarget-*CASP-2S* and pTarget-*HA-CASP-2L-Pro* plasmids. To generate recombinant protein, *CASP-2L-Pro* cDNA was first amplified by PCR with specific adaptor primers containing *EcoRI* sequences at the ATG start codon and *XhoI* sequences at the TGA stop codon. The PCR product was inserted in the pCR-TOPO vector (TA cloning system, InVitrogen, San Diego, CA) and then subcloned in the bacterial expression vector pET-30a (+)-His-TAG (Novagen, Madison, WI) at the *EcoRI* and *XhoI* sites. *Escherichia coli* BL21 (DE3) was transformed with purified plasmids, and recombinant protein expression induced for up to 15 h by adding 100 μM ITPG to exponentially-growing bacteria at room temperature. The bacteria were collected by centrifugation, resuspended in 5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), and samples were sonicated on ice. After centrifugation at 12,000 x g for 20 min, bacterial lysates were applied to a charged and equilibrated Chelating Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech,

Piscataway, NJ) chromatography column. The column was then washed with 10 vol of 5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 6 vol of 50 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), and the bound protein was eluted with 6 vol of 1.0 M imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9). Proteins were concentrated and dialyzed several time in a Centricon^{R} Plus-20 centrifugal device (Millipore, Bedford, MA). The purity of recombinant caspase-2L-Pro was measured by sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Coomassie Blue R-250 staining (not shown).

Expression studies and southern blotting. cDNAs from normal human tissues were obtained from InVitrogen and genomic DNA from transfected lines was extracted by a salting-out procedure (49). *CASP-2L* and *CASP-2L-Pro* cDNAs were amplified with sense primer (5′-ATGGCCGCTGA CAGGGGACGC-3′) and antisense primer (5′-TCAGGAGTGCAAGGCTTCA C-3′). The presence of pTarget-*HA-CASP-2L-Pro* and pTarget-*HA-CASP-2L-ProMut* in the transfected lines, was monitored by PCR using sense and antisense primers directed to internal vector sequences. PCR was performed in a reaction mixture containing 200 μM dNTPs, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 ng of each primer, and 0.5 U Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer Biosystem, Markham, Ont). The reaction mixtures were heated for 5 min at 94°C and amplified for 35 cycles with denaturation at 94°C for 50 sec, annealing at 45°C for 50 sec and extension at 72°C for 30 sec. The amplified products were electrophoresed on 1.2% agarose gel in Tris-acetate buffer (pH 8.0) and gel-stained with ethidium bromide. For Southern blot analysis, DNA was transferred by capillarity to GeneScreen nylon membranes (Dupont-NEM Research Products, Boston, MA). After DNA denaturation and fixation, blots were hybridized with a [α-^{32}P]-dCTP labeled *EcoRI- EcoRI Casp-2L-Pro* DNA restriction fragment. Hybridizations were undertaken overnight at 42°C in a solution containing 2x SSC, 2x Denhart, 2% (w/v) SDS, 50% (v/v) formamide and 100 μg/ml salmon sperm DNA. The blots were washed twice for 20 min at 42°C in 0.2x SSC and 0.1% (w/v) SDS, then for 45 min at 56°C in 0.02x SSC and 0.05% (w/v) SDS. DNA was visualized by autoradiography on Kodak X-AR film.

Protein extraction, co-immunoprecipitation and western blot analysis. The antibodies used in this study included anti-human procaspase-2 pAb that recognize the NH-2 terminal domain of procaspase-2L (Ich-1(Ab-1); Calbiochem-Novabiochem Corporation), anti-HA peptide epitope tag mAb (clone 12CA5; Roche Molecular Biochemicals) and anti-FLAG peptide epitope tag mAb (M2; Upstate Biotechnologies). For protein extraction, the cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% Na-SDS, 0.5% Na-desoxycholate) in the presence of protease inhibitors (0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2.5 μg/ml pepstatin, 10 μg/ml aprotinin, 2.5 μg/ml trypsin inhibitor, 5 μg/ml leupeptin) for 30 min, then centrifuged (20 min, 15,000 x g), and supernatants collected. For immunoprecipitations, control and transfected Namalwa cells were collected by centrifugation, washed twice with ice-cold PBS, and then homogenized in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM $NaVO_4$; 1% BSA; 1% nonidet P-40; 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 1 mg/ml aprotinin) at 4°C for 30 min. Extracts were centrifuged and supernatants collected. Specific anti-HA or anti-FLAG monoclonal antibodies were added for 1 h, and immunocomplexes were captured and precipitated with protein A/G-Sepharose (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA). For western blots, after SDS-PAGE and electrotransfer to nitrocellulose membranes (Amersham Pharmacia Biotech), the membranes were incubated for at least 2 h with 5% nonfat milk in PBST (PBS, 0.1% Tween 20) and for 2-3 h at room temperature with primary antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies were then added for 30-60 min, and proteins revealed by enhanced chemiluminescence reagent (Amersham Pharmacia Biotech) and autoradiography.

Caspase activity assays. For control and drug-treated cell extracts, cells were homogenized at 4°C for 30 min in lysis buffer containing 100 mM HEPES (pH 7.5), 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 20% glycerol (or 10% sucrose for caspase-6 extracts) and 0.3% nonidet P-40, centrifuged (10,000 x g for 15 min at 4°C), and supernatants collected and frozen at -80°C. Typically, 200 μg of extracted proteins per assay were used to monitor caspase activities.

For the cell-free system, cell-free extracts were generated from U937 cells based on previously-described methods (40, 50, 51). Briefly, 2-4 x 10^8 cells were pelleted and washed twice with cold PBS, followed by a single wash with 5 ml of ice-cold cell extract buffer (CEB: 20 mM Hepes-KOH, pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 100 μM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mg/ml leupeptin, 2 mg/ml aprotinin). The cells were pelleted, resuspended in 2 volumes of ice-cold CEB and transferred to a 2-ml Dounce-type homogenizer. They were allowed to swell under hypotonic conditions for 20 min on ice. They were then disrupted with 20-50 strokes of a B-type pestle. Lysis was confirmed by examination of a small aliquot of the suspension under a light microscope. The lysates were centrifugated at 15,000 x g for 15 min at 4°C, and supernatants were frozen in aliquots at -80°C until required. Caspase activation was initiated by adding 50 μg/ml cytochrome c and 1 mM dATP in 100 μg cell-free extract per assay in the absence or presence of various amounts of purified recombinant caspase-2L-Pro protein.

Caspase activities were measured by monitoring fluorescence continuously in a dual luminescence fluorometer (LS 50B Perkin Elmer) using specific emission and excitation wavelengths for the fluorogenic derivative peptides z-VDVAD-AFC, Ac-DEVD-AMC, Ac-LEHD-AFC, Ac-VEID-AFC and MCA-VDVADGWK(DNP)-NH2. Reactions were performed in cuvettes, and temperature maintained at 37°C in a water-jacketed sample compartment. The assay mixture contained 100 mM HEPES (pH 7.5), 20% (v/v) glycerol (or 10% (v/v) sucrose for caspase-6 substrate), 5 mM DTT, 5 mM EDTA and 100 μM fluorogenic peptide substrates. Enzyme activities were determined as initial velocities expressed as relative intensity / min / mg.

Quantitation and analysis of DNA fragmentation. The kinetics of DNA fragmentation were measured by a previously-reported filter DNA elution assay (52). DNA was extracted by a salting-out procedure (49). After electrophoresis in 1.8% agarose gel in Tris-borate-EDTA buffer (pH 8.0), DNA was visualized by ethidium bromide staining.

Yeast 2-hybrid system. The MatchMaker LexA 2-hybrid system (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA) was used as described elsewhere (53). *CASP-2L-Pro* cDNA was subcloned in 2-hybrid plasmid pLexA vector, and *Casp-2L*, *FADD*, *RAIDD* and *APAF-1* cDNAs were subcloned in the 2-hybrid plasmid pB42AD. Sequential transformations were performed by the lithium acetate method in yeast strain EGY48, and the cells were plated on histidine-deficient (for pLexA marker), tryptophan-deficient (for pB42AD marker) and histidine/tryptophan/leucine-deficient (for LEU2 reporter gene assay) minimal SD induction/selection media. *APAF-1* cDNA was kindly provided by Dr. X. Wang (University of Texas Southwestern Center, Dallas, TX), *FADD* and *RAIDD* cDNAs by Dr. V.M. Dixit (University of Michigan Medical School). pLexA-p53, pLexA-Lam and pB42AD-SV40Large T from Clontech Laboratories served as positive and negative controls.

RESULTS

Molecular cloning of *CASP-2L-Pro* cDNA. A set of primers encompassing the open reading frame of *Casp-2L* consistently generated 2 amplified fragments of 1308 and 1090 base-pairs (bp) by RT-PCR. Both fragments were amplified in several human cell lines (HL60, U937, K562, KCL22, Jurkat, BV173, HT29) and hybridized with a specific *CASP-2L* probe (data not shown). Nucleotide sequence analysis revealed that the 1308-bp fragment encoded *CASP-2L* ORF while the 1090-bp fragment represented a shorter variant form that was designated *CASP-2L-Pro* (Fig. 1A). *CASP-2L-Pro* contains the first 256 nt of *CASP-2L* and then differs by an alternative splicing that deletes the next 218 nt. The deletion generates a translational frameshift with a stop codon 18 nt downstream (Fig. 1A-B). *CASP-2L-Pro* encodes a protein of 91 amino acids that contains the prodomain of procaspase-2L in which the CARD is deleted of the last alpha-helix and lacks the subsequent large and small subunits of procaspase-2L (Fig. 1C). The calculated molecular weight of caspase-2L-Pro was estimated at 11 kDa, and the *in vitro* translated product migrated at 15 kDa on SDS gels (Fig. 1D). A similar variant isoform of *CASP-2S* was identified by RT-PCR using a set of primers encompassing the open reading frame of *CASP-2S* and was

designated *CASP-2S-Pro* (data not shown).

Expression of *CASP-2L-Pro*. Based on PCR and southern blot analyses (Fig. 2A-B), *CASP-2L-Pro* was found to be constitutively expressed in a series of normal human tissues, including skin, breast and colon whereas its expression was virtually undetectable in lung, spleen, brain, testis and ovary. A protein of 15 kDa, corresponding to the Mr of caspase-2L-Pro, was also detected in cellular extracts prepared from human B lymphoma Namalwa, monocytic-like leukemic U937 and promyelocytic HL60 cells using polyclonal antibodies raised against the NH-2 terminal domain of procaspase-2L (Fig. 2C). These antibodies also recognized procaspase-2L as a 48-kDa protein (Fig. 2C). A protein of 15 kDa was also detected in Hela and Jurkat cells, suggesting that caspase-2L-Pro is expressed in many cell types (data not shown).

Caspase-2L-Pro specifically interacted with procaspase-2L and RAIDD. Previous studies revealed that procaspase-2L interacted with the adaptor protein RAIDD/CRADD, an interaction that was suppressed by deletion of the prodomain of procaspase-2L (29, 32). In a yeast 2-hybrid assay, caspase-2L-Pro interacted with both procaspase-2L and RAIDD/CRADD while it did not interact with FADD/MORT1 or APAF-1 (Fig. 3A). These interactions were also observed in co-transfected Namalwa cells where pTarget-*HA-CASP-2L-Pro* was transiently transfected with either pCDNA3-*FLAG-RAIDD* or pTarget-*His-CASP-2L*. Immunoprecipitations with anti-FLAG or anti-HA monoclonal antibodies were followed by immunoblottings with anti-FLAG (Fig. 3B) and anti-procaspase-2 antibodies (Fig. 3C). The caspase-2L-Pro/procaspase-2L interaction appeared weaker than the caspase-2L-Pro/RAIDD interaction, both in the yeast 2-hybrid assay and in co-transfected cells.

Caspase-2L-Pro interfered with caspase activities *in vitro*. To determine whether caspase-2L-Pro could modulate the activation of other caspases, we used a previously- described cell-free system in which the caspase cascade is activated by the addition of cytochrome c and dATP (40, 50,

51). Cell-free extracts were prepared from untreated U937 cells, and caspase activities were monitored with a series of fluorogenic peptide substrates in the absence or presence of recombinant caspase-2L-Pro protein. The addition of recombinant caspase-2L-Pro induced dose-dependent inhibition of z-VDVAD-AFC (caspase-2L substrate), Ac-DEVD-AMC (caspase-3, -7 and -2L substrate), Ac-VEID-AFC (caspase-6 substrate) and Ac-LEHD-AFC (caspase-9 substrate) hydrolysis (Fig. 4). Recombinant Bcl-xL protein deleted of its carboxy-terminal anchor transmembrane domain was used as a negative control. In cellular extracts obtained from apoptotic U937 cells, the addition of recombinant Bcl-xL protein (up to 20 μg) had no inhibitory effect on caspase activities (data not shown (54)).

Transient transfection of *CASP-2L-Pro* induced low level of apoptosis in Namalwa cells. Several point mutations in the prodomain sequence of procaspase-2L, including L41F, G78R, L89A, F85A, F82A or D83A/E87A, were found to prevent procaspase-2L interaction with RAIDD, while D83A or E87A substitutions had no effect on this interaction (29). By directed mutagenesis, we generated the *CASP-2L-Pro* double mutant carrying D83A/E87A substitutions (*HA-CASP-2L-ProMut*, Fig. 5A). In transient cell death assays, transfection of wild-type *CASP-2L-Pro* increased the level of DNA fragmentation and apoptosis in Namalwa cells, compared with cells transfected with the empty vector (Fig. 5B). In contrast, *CASP-2L-ProMut* transfection did not increase the level of DNA fragmentation and apoptosis in these cells (Fig. 5B), revealing the importance of a functional CARD domain for this effect.

Stable expression of caspase-2L-Pro inhibited apoptosis induced by various stimuli. Mixed populations of Namalwa cells transfected with empty pTarget, pTarget-*HA-CASP-2L-Pro* and pTarget-*HA-CASP-2L-ProMut* vectors, were selected under 1.5 mg/ml geniticin. PCR analysis of genomic DNA, using specific primers directed to vector sequences, demonstrated the presence of the insert in the selected cell population (Fig. 6A). Western blot analysis revealed the presence of endogenous procaspase-2L and exogenous HA-caspase-2L-Pro wild-type and double mutant, in the transfected lines

(Fig. 6B). To evaluate the effect of their expression, cells were exposed to various apoptotic stimuli, including cell death receptor agonists (anti-Fas mAb, TNF-α) and DNA topoisomerase I (camptothecin, CPT) and II (etoposide, VP16) inhibitors. The kinetics of DNA fragmentation were monitored by filter DNA elution assay and visualized by agarose gel electrophoresis. Overexpression of wild-type caspase-2L-Pro delayed the occurrence of DNA fragmentation induced by agonist Fas mAb, VP16, TNF-α and CPT, compared to empty vector-transfected cells, an effect that was partially or totally prevented by the presence of caspase-2L-ProMut (Fig. 6 C-D).

Caspase-2L-Pro interfered with caspase activation in etoposide-treated cells. The kinetics of caspase activities were monitored in transfected cells after VP16 treatment. Overexpression of caspase-2L-Pro interfered with activation of various caspases involved in the hydrolysis of Ac-LEHD-AFC (caspase-9 substrate), Ac-DEVD-AMC (caspase-3, -7 and –2L substrate), MCA-VDVADGWK(DNP)-NH2 (caspase-2L substrate) and Ac-VEID-AFC (caspase-6 substrate). In accordance with the kinetics of DNA fragmentation, inhibition of caspase activities observed in Namalwa cells overexpressing wild-type caspase-2L-Pro was either less significant (MCA-VDVADGWK(DNP)-NH2 hydrolysis) or absent (Ac-DEVD-AMC, Z-VEID-AFC and Ac-LEHD-AFC hydrolysis) in cells overexpressing the D83A/E87A mutant (Fig. 7).

DISCUSSION

Several endogenous proteins that either directly or indirectly interfere with caspase activation have been identified in human cells. These proteins include six inhibitors of apoptosis (IAP), known as NIAP, cIAP-1/HIAP-2/hMIHB, cIAP-2/HIAP-1/hMIHC, X-IAP, Survivin and Apollon, that are structurally characterized by at least 1 BIR domain (55). The majority of IAPs inhibit some members of the caspase family, either directly or indirectly, though they also demonstrated caspase-independent inhibitory mechanisms such as those mediated by activation of the transcriptional factor NF-kB (56-

58) and those that involved a mitotic spindle checkpoint (59). Another protein that negatively interferes with caspase activation is cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP, also called Casper/I-FLICE/FLAME-1/CASH /CLARP/MRIT/Usurpin), an inactive homolog of caspase-8 and caspase-10 that may act as a competitive inhibitor by impeding the binding of these caspases to the cytosolic domain of death receptors (60). In addition, the alternative spliced isoform of *CASP-9* gene, that encodes a short variant of procaspase-9, negatively interferes with procaspase-9 activation, while 1 isoform of *CASP-8* (caspase-8α3) impedes Fas- and TNFR-1-mediated cell death (23, 46, 47). In the present study, we noted that an alternative spliced isoform of *CASP-2* gene, that encodes a prodomain-only form of the caspase in which the CARD is deleted of the last α-helix, also behaves as an endogenous inhibitor of caspases.

Other *CASP* genes that have been shown to encode several isoforms include *CASP-1, -6, -7, -8, -9,* and *–10* (22, 23, 41-47). These isoforms are most likely splice variants (61). Their expression depends on the tissue or the cell line examined. For example, caspase-1ε isoform is highly expressed in peripheral blood neutrophils and placenta (41), the short variant isoform of *CASP-9* gene is detected mainly in skeletal muscle (46, 47), while the various isoforms of *CASP-10* gene are expressed in several fetal tissues, mainly skeletal muscle, lung and kidney, but are virtually undetectable in adult tissues (45). We have previously described the heterogeneous expression of *CASP-2L* and *CASP-2S* isoforms in various acute myelogenous leukemia samples (62). Here, we show that endogenous expression of *CASP-2L-Pro* varies widely in normal human adult tissues, from very low levels in the lung, spleen, brain, testis and ovary to higher expression levels in the skin and breast. The expression of caspase-2L-Pro also varies among diverse human leukemic cell lines. These results suggest that the physiological role of the various caspase isoforms in modulating apoptotic pathways might be highly tissue-specific.

Among the various caspase variants, caspase-2S was demonstrated to prevent apoptosis of Rat-1 cells when deprived of growth factors (27), caspase-8α3 impeded Fas- and TNFR-1- mediated cell death (23), and the recently-described short variant of caspase-9, that lacks the catalytic site, was

reported to negatively interfere with various apoptotic stimuli by competitively interacting with the CARD of APAF-1, thus preventing procaspase-9/APAF-1 interaction (46, 47). Conversely, the short isoform of caspase-10 designated as caspase-10/c, that is essentially a prodomain-only form of the caspase and also lacks proteolytic activity, can amplify the TNF-α-mediated death signal by inducing the formation of perinuclear filamentous structures (45). *CASP-1* gene was reported to encode 5 isoforms, including 3 whose overexpression induces apoptosis while the 2 others increase the survival of baculovirus-infected cells (41). In addition, stable overexpression of the 11.5-kDa prodomain of caspase-1 in HeLa cells was recently found to enhance Fas-mediated apoptosis, upstream of caspase-8 activation (63). However, the biological significance of caspase variants remains mostly unclear.

Like several caspase isoforms, the caspase-2L-Pro variant of caspase-2 lacks any catalytic site. With a yeast 2-hybrid system, we demonstrated that caspase-2L-Pro can interact with the adaptor protein RAIDD and, to a lesser extent, with procaspase-2L. The prodomain of procaspase-2 contains a single copy of CARD that was shown to interact with the CARD present in RAIDD, probably through electrostatic bound between the 2 domains (26). RAIDD also contains a death domain in its carboxy terminal region, which interacts with a death domain present in RIP, a serine/threonine kinase that is recruited to TNFR-1 and is required for TNF-mediated activation of NF-kB (64). It remains unclear whether interaction between RAIDD and procaspase-2L is necessary for activation of caspase-2L and the downstream caspase cascade in response to TNF or other cytokines (12). If this is the case, the interaction of caspase-2L-Pro with RAIDD could prevent interaction of procaspase-2L with the adaptor molecule, which could account for the decreased sensitivity of cells overexpressing caspase-2L-Pro to TNF-mediated cell death. Caspase-2L-Pro could also interfere with the formation of RAIDD-procaspase-2L complexes that have been observed in the nucleus following treatment with various apoptosis inducers (38). Regardless of the mechanism, mutations of caspase-2L-Pro that prevent RAIDD/procaspase-2L interaction, suppress the protective effect of caspase-2L-Pro towards apoptosis induced by TNF-α and other death stimuli.

Although weaker than its interaction with RAIDD, interaction of caspase-2L-Pro with procaspase-2L could interfere with procaspase-2L oligomerization that mediates its activation. Several recent studies have established that procaspase oligomerization can induce caspase activation (10, 65, 66). Homodimerization of procaspase-1 or procaspase-2, that occurs prior to caspase processing, has been shown to require their respective caspase prodomain (67-69). However, the prodomain-prodomain interaction alone is not sufficient to stabilize the dimers of Nedd2 precursors, the mouse homolog of human procaspase-2L. In addition to the prodomain, dimerization of Nedd2 precursor requires the C-terminus of the protein (69). Thus, interaction of caspase-2L-Pro with the prodomain of procaspase-2L may not be sufficient to induce autoprocessing of the proenzyme but could prevent its homodimerization. This homodimerization is required for processing of the precursor caspase and activation, since prodomain-less caspase-2 does not undergo significant processing into active subunits (69).

In transient cell killing assays, ectopic expression of caspase-2L-Pro induced very low levels of cell death by apoptosis. Transient expression of the prodomain of procaspase-8 has also been shown to induce low levels of apoptosis in both 293T and MCF-7 cell lines (23). A similar observation was made by transiently expressing CARD- (29) and DED- (70, 71) containing adaptor proteins in various cell lines. Overexpression of caspase-10/c (45) as well as that of the prodomain of caspase-1 (72) induced high levels of apoptosis in MCF-7 and 293T cell lines, respectively. Expression of caspase-10/c above an undefined concentration threshold results in the formation of insoluble filamentous cytosolic or subnuclear structures (45). These structures apparently act as a scaffold to recruit and facilitate the autoactivation of cytoplasmic or nuclear procaspases (38, 48). A truncated RAIDD molecule consisting of the residues 1-80, which lacked helix 6 of the CARD, was unable to form filaments in transfected cells, suggesting that an intact CARD structure was required for filament formation (38). Since caspase-2L-Pro does not contain the last α-helix, the formation of filamentous structures might not account for the limited toxicity of caspase-2L-Pro observed in transient transfection experiments.

Selected cells that stably overexpress caspase-2L-Pro showed significant

inhibition of agonist Fas Ab-, TNFα-, etoposide- and camptothecin-induced apoptosis, indicating that caspase-2L-Pro acted as an inhibitory protein. Although RAIDD has not been implicated in these apoptotic pathways, our observation that mutation of amino acids involved in caspase-2L-Pro interaction with RAIDD suppressed its anti-apoptotic activity supports a role for RAIDD-procaspase-2L complexes in cell death pathways induced by these stimuli. Wild-type caspase-2L-Pro interfered with various caspase activities in both etoposide-treated cells and a cell-free system. Since no interaction was detected between caspase-2L-Pro and APAF-1 in the yeast 2-hybrid assay, caspase-2L-Pro may not impede the formation of APAF-1/procaspase-9 complex. One possibility is that caspase-2L-Pro interacts with the APAF-1 homolog designated CARD-4/NOD-1, a protein that also interacts with and activates procaspase-9 (73, 74).

In conclusion, caspase-2L-Pro is a caspase variant that is expressed in several normal human tissues and cancer cell lines, and negatively interferes with death receptor- and drug-mediated apoptosis by preventing caspase activation. In some cell types, caspase-2L-Pro could contribute to prevent procaspase-2L autoactivation by interfering either with its prodomain, thereby preventing dimerization of the proenzyme, or with an adaptor molecule such as RAIDD to prevent its recruitment. This caspase isoform could also prevent premature caspase activation by participating in the complex process that generates active subunits. Regardless of the mechanism of action of caspase-2L-Pro, these results indicate that regulation of *CASP* gene transcription and alternative splicing could play an important role in the modulation of apoptotic pathways, including those triggered by anticancer drugs and cytokines.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MT-15019) to RB and grants from the departmental committees (Côte d'Or, Nièvre, Saône et Loire) of the Ligue Nationale Contre le Cancer, the Association pour la Recherche contre le Cancer (# 9567) and the Conseil Régional de Bourgogne to ES. RB is a scholar from the Medical Research Council of Canada and the Cancer Research Society Inc. (Canada). ND received support from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement et de la Recherche, the Société Française d'Hématologie and the French Ministère des Affaires Etrangères. Ther authors acknowledge the editorial work on this manuscript by Ovid DaSilva, Centre de recherche, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

REFERENCES

1. 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.
2. Vaux, D. L., and Korsmeyer, S. J., Cell death in development, Cell, *96*, 245-254, 1999.
3. Rathmell, J. C., and Thompson, C. B., The central effectors of cell death in the immune system, Annu Rev Immunol, *17*, 781-828, 1999.
4. Thompson, C., Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, Science, *267*, 1456-1462, 1995.
5. 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.
6. Reed, J. C., Bcl-2 family proteins - Regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies, Semin Hematol, *34*, 9-19, 1997.
7. Schmitt, E., Sane, A. T., and Bertrand, R., Activation and role of caspases in chemotherapy-induced apoptosis, Drug Resist Updates, *2*, 21-29, 1999.
8. 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.
9. Cryns, V., and Yuan, J. Y., Proteases to die for, Genes Dev, *12*, 1551-1570, 1998.
10. Salvesen, G. S., and Dixit, V. M., Caspase activation: the induced-proximity model, Proc Natl Acad Sci (U S A), *96*, 10964-10967, 1999.
11. Nicholson, D. W., Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death, Cell Death Differ, *6*, 1028-1042, 1999.

12. Kumar, S., and Colussi, P. A., Prodomains-adaptors-oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis, Trends Biochem Sci, *24*, 1-4, 1999.
13. Slee, E. A., Adrain, C., and Martin, S. J., Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis, Cell Death Differ, *6*, 1067-1074, 1999.
14. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X. S., Lutschg, A., and Wang, X. D., Apaf-1, a human protein homologous to C. Elegans Ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3, Cell, *90*, 405-413, 1997.
15. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X., Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, Cell, *91*, 479-489, 1997.
16. Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S., Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization, Mol Cell, *1*, 949-957, 1998.
17. Qin, H., Srinivasula, S. M., Wu, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S., and Shi, Y., Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1, Nature, *399*, 549-557, 1999.
18. Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D., A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain, J Biol Chem, *270*, 7795-7798, 1995.
19. Chinnaiyan, A., O'Rouke, K., Tewari, M., and Dixit, V., FADD a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis, Cell, *81*, 505-512, 1995.
20. Chinnaiyan, A. M., Tepper, C. G., Seldin, M. F., O'Rourke, K., Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M., Fadd/Mort1 is a common mediator of CD95 (Fas/Apo-1) and Tumor Necrosis Factor receptor-induced apoptosis, J Biol Chem, *271*, 4961-4965, 1996.
21. 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., 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, 1996.
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., and Alnemri, E. S., In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FDD-like domains, Proc Natl Acad Sci (USA), *93*, 7464-7469, 1996.
23. Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D., Involvement of Mach, a novel Mort1/Fadd-interacting protease, in Fas/Apo-1- and Tnf receptor-induced cell death, Cell, *85*, 803-815, 1996.
24. Huang, B. H., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., and Fesik, S. W., Nmr structure and mutagenesis of the Fas (Apo-1/Cd95) death domain, Nature, *384*, 638-641, 1996.
25. Eberstadt, M., Huang, B. H., Chen, Z. H., Meadows, R. P., Ng, S. C., Zeng, L. X., Lenardo, M. J., and Fesik, S. W., Nmr structure and mutagenesis of the Fadd (Mort1) death-effector domain, Nature, *392*, 941-945, 1998.
26. Chou, J. J., Matsuo, H., Duan, H., and Wagner, G., Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment, Cell, *94*, 171-180, 1998.

27. Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H., and Yuan, J., Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death, Cell, *78*, 739-750, 1994.
28. Kumar, S., and Harvey, N. L., Role of multiple cellular proteases in the execution of programmed cell death, FEBS Lett, *375*, 169-173, 1995.
29. Duan, H., and Dixit, V. M., Raidd is a new death adaptor molecule, Nature, *385*, 86-89, 1997.
30. Harvey, N. L., Butt, A. J., and Kumar, S., Functional activation of Nedd2/Ich-1 (Caspase-2) is an early process in apoptosis, J Biol Chem, *272*, 13134-13139, 1997.
31. Stefanis, L., Troy, C. M., Qi, H. Q., Shelanski, M. L., and Greene, L. A., Caspase-2 (Nedd-2) processing and death of trophic factor-deprived PC12 cells and sympathetic neurons occur independently of caspase-3 (Cpp32)-like activity, J Neurosci, *18*, 9204-9215, 1998.
32. Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Wang, L. J., Talanian, R. V., Litwack, G., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S., Cradd, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and Fas/Tumor necrosis factor receptor-interacting protein Rip, Cancer Res, *57*, 615-619, 1997.
33. Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V., The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation, Cell, *81*, 495-504, 1995.
34. Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannilkulchai, 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., and Wallach, D., 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, 1998.
35. 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., and Yuan, J. Y., Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice, Genes Dev, *12*, 1304-1314, 1998.
36. Colussi, P. A., Harvey, N. L., and Kumar, S., Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor - a novel function for a caspase prodomain, J Biol Chem, *273*, 24535-24542, 1998.
37. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P. M., and Kroemer, G., Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process, J Exp Med, *189*, 381-393, 1999.
38. Shearwin-Whyatt, L. M., Harvey, N. L., and Kumar, S., Subcellular localization and CARD-dependent oligomerization of the death adaptor RAIDD, Cell Death Differ, *7*, 155-165, 2000.
39. Mancini, M., Machamer, C. E., Roy, S., Nicholson, D. W., Thornberry, N. A., Casciola-Rosen, L. A., and Rosen, A., Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis, J Cell Biol, *149*, 603-612, 2000.
40. 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., and Martin, S. J., Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner, J Cell Biol, *144*, 281-292, 1999.

41. Alnemri, E. S., Fernandes-Alnemri, T., and Litwack, G., Cloning and expression of four novel isoforms of human interleukin-1 beta converting enzyme with different apoptotic activities, J Biol Chem, *270*, 4312-4317, 1995.
42. Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E. S., Mch2, a new member of the apoptotic Ced-3/Ice cysteine protease gene family, Cancer Res, *55*, 2737-2742, 1995.
43. Fernandes-Alnemri, T., Takahashi, A., Armstrong, R., Krebs, J., Fritz, L., Tomaselli, K. J., Wang, L., Yu, Z., Croce, C. M., Salveson, G., Earnshaw, W. C., Litwack, G., and Alnemri, E. S., Mch3, a novel human apoptotic cysteine protease highly related to Cpp32, Cancer Res, *55*, 6045-6052, 1995.
44. Scaffidi, C., Medema, J. P., Krammer, P. H., and Peter, M. E., Flice is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b, J Biol Chem, *272*, 26953-26958, 1997.
45. Ng, P. W. P., Porter, A. G., and Janicke, R. U., Molecular cloning and characterization of two novel pro-apoptotic isoforms of caspase-10, J Biol Chem, *274*, 10301-10308, 1999.
46. Seol, D. W., and Billiar, T. R., A caspase-9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis, J Biol Chem, *274*, 2072-2076, 1999.
47. Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Guo, Y., Zhan, Y., Lazebnik, Y., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S., Identification of an endogenous dominant-negative short isoform of caspase-9 that can regulate apoptosis, Cancer Res, *59*, 999-1002, 1999.
48. Siegel, R. M., Martin, D. A., Zheng, L. X., Ng, S. Y., Bertin, J., Cohen, J., and Lenardo, M. J., Death-effector filaments - Novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis, J Cell Biol, *141*, 1243-1253, 1998.
49. Miller, S. A., Dykes, D. D., and Polesky, H. F., A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, Nucleic Acids Res, *16*, 1215, 1988.
50. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., and Wang, X., Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c, Cell, *86*, 147-157, 1996.
51. Pan, G. H., Humke, E. W., and Dixit, V. M., Activation of caspases triggered by cytochrome C in vitro, FEBS Lett, *426*, 151-154, 1998.
52. 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.
53. Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M., Dever-Bertrand, J., and Bertrand, R., Characterization of Bax-s, a novel cell death-inducing isoform of Bax, Biochem Biophys Res Comm, *270*, 868-879, 2000.
54. Schmitt, E., Cimoli, G., Steyaert, 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.
55. Deveraux, Q. L., and Reed, T. C., IAP family proteins - suppressors of apoptosis, Genes Dev, *13*, 239-252, 1999.
56. Chu, Z. L., McKinsey, T. A., Liu, L., Gentry, J. J., Malim, M. H., and Ballard, D. W., Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis C-Iap2 is under Nf-Kappa-B control, Proc Natl Acad Sci (USA), *94*, 10057-10062, 1997.

57. Stehlik, C., Demartin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J. A., Binder, B. R., and Lipp, J., Nuclear factor (Nf)-Kappa-B-regulated X-chromosome-linked Iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis, J Exp Med, *188*, 211-216, 1998.
58. Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., and Baldwin, A. S., Nf-Kappa-B antiapoptosis - induction of Traf1 and Traf2 and C-Iap1 and C-Iap2 to suppress caspase-8 activation, Science, *281*, 1680-1683, 1998.
59. Li, F. Z., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C., and Altieri, D. C., Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin, Nature, *396*, 580-584, 1998.
60. Tschopp, J., Irmler, M., and Thome, M., Inhibition of Fas death signals by FLIPs, Current Op Immunol, *10*, 552-558, 1998.
61. Jiang, Z. H., Zhang, W. J., Rao, Y., and Wu, J. Y., Regulation of Ich-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors, Proc Natl Acad Sci USA, *95*, 9155-9160, 1998.
62. Droin, N., Dubrez, L., Eymin, B., Renvoize, C., Breard, J., Dimancheboitrel, M. T., and Solary, E., Upregulation of Casp genes in human tumor cells undergoing etoposide-induced apoptosis, Oncogene, *16*, 2885-2894, 1998.
63. Tatsuta, T., Shiraishi, A., and Mountz, J. D., The prodomain of caspase-1 enhances Fas-mediated apoptosis through facilitation of caspase-8 activation, J Biol Chem, *275*, 14248-14254, 2000.
64. Kelliher, M. A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B. Z., and Leder, P., The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal, Immunity, *8*, 297-303, 1998.
65. MacCorkle, R. A., Freeman, K. W., and Spencer, D. M., Synthetic activation of caspases - Artificial death switches, Proc Natl Acad Sci (USA), *95*, 3655-3660, 1998.
66. Colussi, P. A., Harvey, N. L., Shearwinwhyatt, L. M., and Kumar, S., Conversion of procaspase-3 to an autoactivating caspase by fusion to the caspase-2 prodomain, J Biol Chem, *273*, 26566-26570, 1998.
67. Gu, Y., Wu, J., Faucheu, C., Lalanne, J. L., Diu, A., Livingston, D. J., and Su, M. S., Interleukin-1 beta converting enzyme requires oligomerization for activity of processed forms in vivo, Embo J, *14*, 1923-1931, 1995.
68. Van Criekinge, W., Beyaert, R., Vandecraen, M., Vandenabeele, P., Schotte, P., Devalck, D., and Fiers, W., Functional characterization of the prodomain of interleukin-1-Beta-converting enzyme, J Biol Chem, *271*, 27245-27248, 1996.
69. Butt, A. J., Harvey, N. L., Parasivam, G., and Kumar, S., Dimerization and autoprocessing of the Nedd2 (Caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxyl-terminal regions, J Biol Chem, *273*, 6763-6768, 1998.
70. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M., FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis, Cell, *81*, 505-512, 1995.
71. Irmler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, B., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E., and Tschopp, J., Inhibition of death receptor signals by cellular Flip, Nature, *388*, 190-195, 1997.

72. Mao, P. L., Jiang, Y. L., Wee, B. Y., and Porter, A. G., Activation of caspase-1 in the nucleus requires nuclear translocation of pro-caspase-1 mediated by its prodomain, J Biol Chem, *273*, 23621-23624, 1998.
73. Bertin, J., Nir, W. J., Fischer, C. M., Tayber, O. V., Errada, P. R., Grant, J. R., Keilty, J. J., Gosselin, M. L., Robison, K. E., Wong, G. H. W., Glucksmann, M. A., and DiStefano, P. S., Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappa B, J Biol Chem, *274*, 12955-12958, 1999.
74. Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J., and Nunez, G., Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB, J Biol Chem, *274*, 14560-14567, 1999.

A

```
CASP-2L        1  ATGGCCGCTG ACAGGGGACG CAGGATATTG GGAGTGTGTG GCATGCATCC TCATCATCAC
CASP-2L-Pro    1  ATGGCCGCTG ACAGGGGACG CAGGATATTG GGAGTGTGTG GCATGCATCC TCATCATCAC
CASP-2L       61  GAAACTCTAA AAAAGAACCG AGTGGTGCTA GCCAAACAGC TGTTGTTGAG CGAATTGTTT
CASP-2L-Pro   61  GAAACTCTAA AAAAGAACCG AGTGGTGCTA GCCAAACAGC TGCTGTTGAG CGAATTGTTT
CASP-2L      121  GAACATCTTC TGGAGAAGGA CATCATCACC TTGGAAATGA GGGAGCTCAT CCAGGCCAAA
CASP-2L-Pro  121  GAACATCTTC TGGAGAAGGA CATCATCACC TTGGAAATGA GGGAGCTCAT CCAGGCCAAA
CASP-2L      181  GTGGGCAGTT TCAGCCAGAA TGTGGAACTC CTCAACTTGC TGCCTAAGAG GGGTCCCCAA
CASP-2L-Pro  181  GTGGGCAGTT TCAGCCAGAA TGTGGAACTC CTCAACTTGC TGCCTAAGAG GGGTCCCCAA
CASP-2L      241  GCTTTTGATG CCTTCTGTGA AGCACTGAGG GAGACCAAGC AAGGCCACCT GGAGGATATC
CASP-2L-Pro  241  GCTTTTGATG CCTTCT.... .......... .......... .......... ..........
CASP-2L      301  TTGCTCACCA CCCTTTCTGG GCTTCAGCAT GTACTCCCAC CGTTGAGCTG TGACTACGAC
CASP-2L-Pro  256  .......... .......... .......... .......... .......... ..........
CASP-2L      361  TTGAGTCTCC CTTTTCCGGT GTGTGAGTCC TGTCCCCTTT ACAAGAAGCT CCGCCTGTCC
CASP-2L-Pro  256  .......... .......... .......... .......... .......... ..........
CASP-2L      421  ACAGATACTG TGGAACACTC CCTAGACAAT AAAGATGGTC CTGTCTGCCT TCAGGTGAAC
CASP-2L-Pro  256  .......... .......... .......... .......... .......... ....GTGAAC
CASP-2L      481  CCTTGCACTC CTGAATTTTA TCAAACACAC TTCCAGCTGG CATATAGGTT GCAGTCTCGC
CASP-2L-Pro  263  CCTTGCACTC CTGAATTTTA TCAAACACAC TTCCAGCTGG CATATAGGTT GCAGTCTCGC
CASP-2L      541  CCTCGTGGCC TAGCACTGGT GTTGAGCAAT GTGCACTTCA CTGGAGAGAA AGAACTGGAA
CASP-2L-Pro  323  CCTCGTGGCC TAGCACTGGT GTTGAGCAAT GTGCACTTCA CTGGAGAGAA AGAACTGGAA
CASP-2L      601  TTTCGCTCTG GAGGGGATGT GGACCACAGT ACTCTAGTCA CCCTCTTCAA GCTTTTGGGC
CASP-2L-Pro  383  TTTCGCTCTG GAGGGGATGT GGACCACAGT ACTCTAGTCA CCCTCTTCAA GCTTTTGGGC
CASP-2L      661  TATGACGTCC ATGTTCTATG TGACCAGACT GCACAGGAAA TGCAAGAGAA ACTGCAGAAT
CASP-2L-Pro  443  TATGACGTCC ATGTTCTATG TGACCAGACT GCACAGGAAA TGCAAGAGAA ACTGCAGAAT
CASP-2L      721  TTTGCACAGT TACCTGCACA CCGAGTCACG GACTGCTGCA TCGTGGCACT CCTCTCGCAT
CASP-2L-Pro  503  TTTGCACAGT TACCTGCACA CCGAGTCACG GACTGCTGCA TCGTGGCACT CCTCTCGCAT
CASP-2L      781  GGTGTGGAGG GCGCCATCTA TGGTGTGGAT GGGAAACTGC TCCAGCTCCA AGAGGTTTTT
CASP-2L-Pro  563  GGTGTGGAGG GCGCCATCTA TGGTGTGGAT GGGAAACTGC TCCAGCTCCA AGAGGTTTTT
CASP-2L      841  CAGCTCTTTG ACAACGCCAA CCGCCCAAGC CTACAGAACA AACCAAAAAT GTTCTTCATC
CASP-2L-Pro  623  CAGCTCTTTG ACAACGCCAA CCGCCCAAGC CTACAGAACA AACCAAAAAT GTTCTTCATC
CASP-2L      901  CAGGCCTGCC GTGGAGATGA GACTAATCGT GGGGTTGACC AACAAGATGG AAAGAACCAC
CASP-2L-Pro  683  CAGGCCTGCC GTGGAGATGA GACTAATCGT GGGGTTGACC AACAAGATGG AAAGAACCAC
CASP-2L      961  GCAGGATCCC CTGGGTGCGA GGAGAGTGAT GCCGGTAAAG AAAAGTTGCC GAAGATGAGG
CASP-2L-Pro  743  GCAGGATCCC CTGGGTGCGA GGAGAGTGAT GCCGGTAAAG AAAAGTTGCC GAAGATGAGG
CASP-2L     1021  CTGCCCACGC GCTCAGACAT GATATGCGGC TATGCCTGCC TCAAAGGGAC TGCCGCCATC
CASP-2L-Pro  803  CTGCCCACGC GCTCAGACAT GATATGCGGC TATGCCTGCC TCAAAGGGAC TGCCGCCATC
CASP-2L     1081  CGGAACACCA AACGAGGTTC CTGGTACATC GAGGCTCTTG CTCAAGTGTT TTCTGAGCGC
CASP-2L-Pro  863  CGGAACACCA AACGAGGTTC CTGGTACATC GAGGCTCTTG CTCAAGTGTT TTCTGAGCGC
CASP-2L     1141  GCTTGTGATA TGCACGTGGC CGACATGCTG GTTAAGGTGA ACGCACTTAT CAAGGATCGC
CASP-2L-Pro  923  GCTTGTGATA TGCACGTGGC CGACATGCTG GTTAAGGTGA ACGCACTTAT CAAGGATCGC
CASP-2L     1201  GAAGGTTATG CTCCTGGCAC AGAATTCCAC CGGTGCAAGG AGATGTCTGA ATACTGCAGC
CASP-2L-Pro  983  GAAGGTTATG CTCCTGGCAC AGAATTCCAC CGGTGCAAGG AGATGTCTGA ATACTGCAGC
CASP-2L     1261  ACTCTGTGCC GCCACCTCTA CCTGTTCCCA GGACACCCTC CCACATGA
CASP-2L-Pro 1043  ACTCTGTGCC GCCACCTCTA CCTGTTCCCA GGACACCCTC CCACATGA
```

B

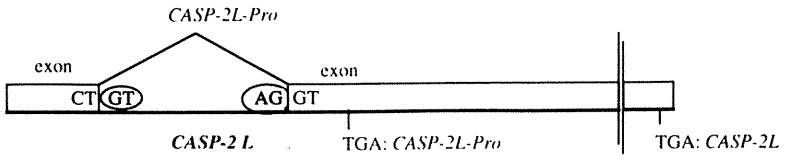


Figure. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of caspase-2L- Pro.

A) Nucleotide sequence alignment of *CASP-2L* and *CASP-2L-Pro*. GT and AG conserved splice sites are underlined in *CASP-2L* sequence.
B) Organization of *CASP-2L-Pro*. GT and AG conserved splice sites are surrounded. *CASP- 2L* and *CASP-2L-Pro* stop codons are indicated.

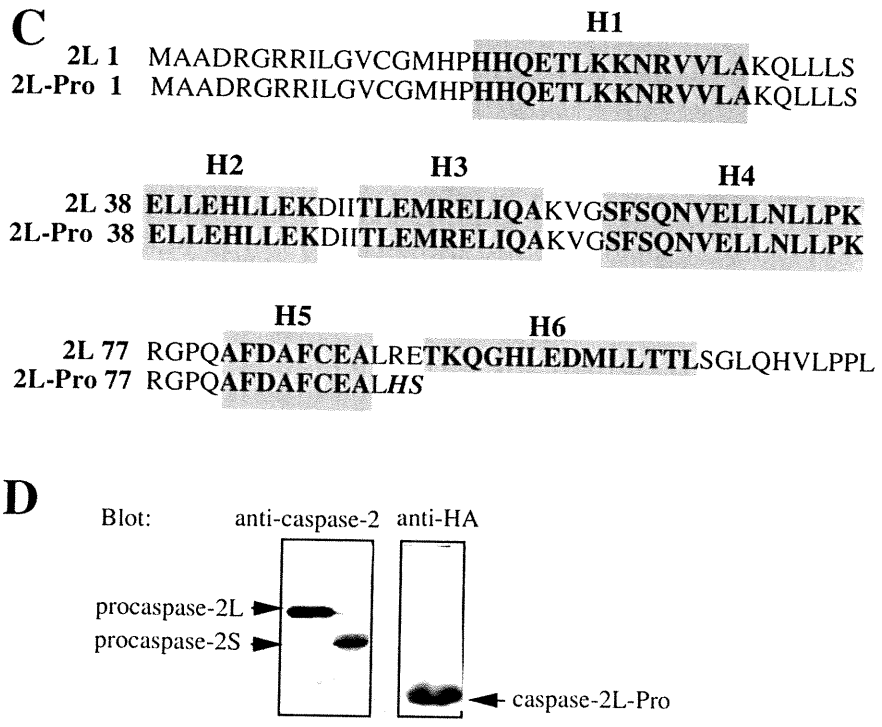


Figure. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of caspase-2L- Pro.

C) Deduced amino acid sequence of caspase-2L-Pro compared to procaspase-2L. Boxes indicate alpha-helices of the caspase recruitment domain.
D) Western blots of procaspase-2L, procaspase-2S and HA-caspase-2L-Pro generated *in vitro* by TNT-coupled transcription/translation assay. The translated products were fractionnated on 12% SDS-PAGE , detected by anti-caspase-2 or anti-HA antibodies, and revealed by enhanced chemiluminescence.

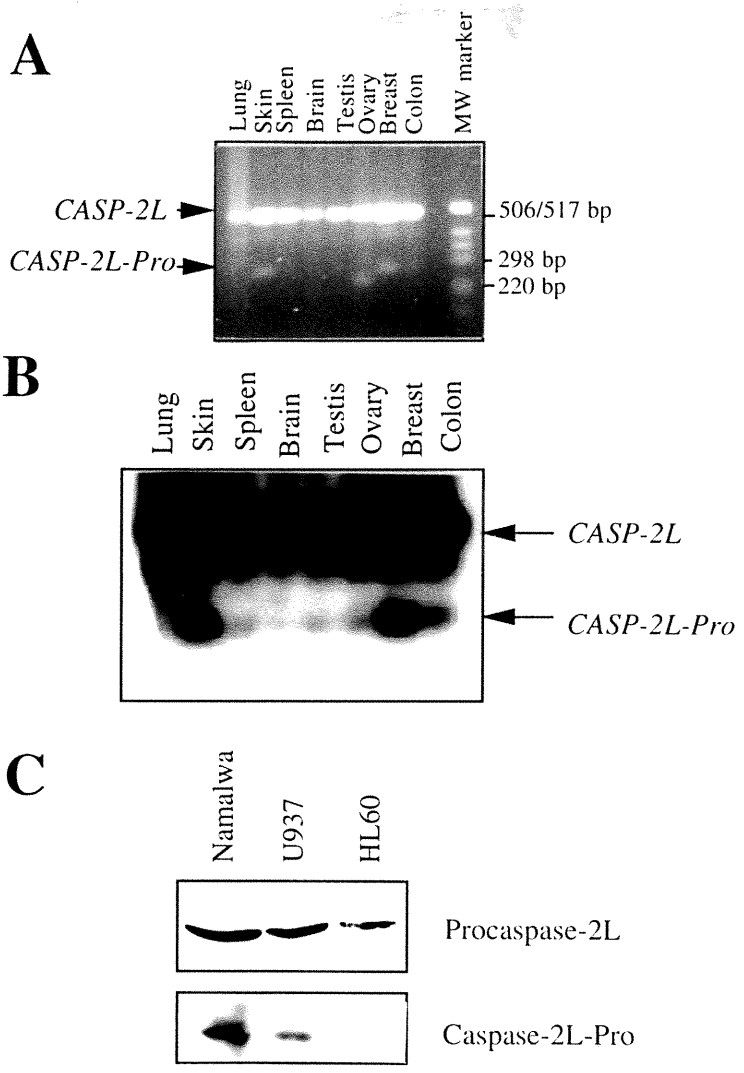


Figure. 2 Expression of caspase-2L-Pro in human tissues and cancer cell lines.

A) PCR analysis of *CASP-2L* and *CASP-2L-Pro* expression in normal human tissues. The PCR products were analyzed on agarose gel stained by ethidium bromide after electrophoresis. *CASP-2L* and *CASP-2L-Pro* fragments are indicated by arrows. The 205-bp fragment observed in the ovary is a nonspecific PCR product.

B) Southern blot analysis of PCR products using a [α-^{32}P]-dCTP *EcoRI-EcoRI Casp-2L-Pro* DNA restriction fragment as probe.

C) Western blot analysis of procaspase-2L and caspase-2L-Pro in Namalwa, U937 and HL60 cell lines. 200 μg proteins were loaded per lane. After electrophoresis and transfer, procaspase-2L and caspase-2L-Pro were detected by caspase-2 polyclonal antibodies raised against the prodomain of caspase-2L, and revealed by enhanced chemiluminescence.

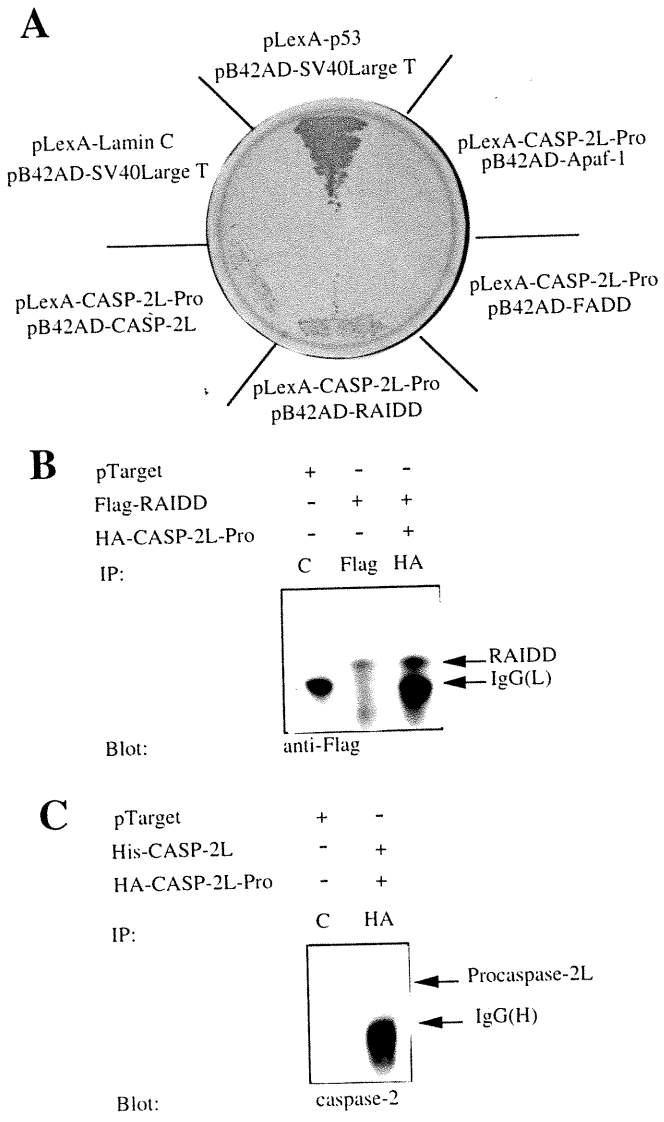


Figure. 3 Caspase-2L-Pro interacts with procaspase-2L and RAIDD

.

A) In a yeast 2-hybrid assay, EGY 48 yeast cells containing caspase-2L-Pro fused to the LexA DNA-binding domain were grown in selective medium in the presence of various proteins fused to the B42 DNA activation domain, as indicated. The positive control in the 2-hydrid assay represents pLexA p53 and pB42 SV40 T and the negative control represents pLexA lamin C and pB42 SV40 T.

B) Namalwa cells were transiently transfected by electroporation with empty pTarget, pCDNA3-*FLAG-RAIDD* or co-transfected with pCDNA3-*FLAG-RAIDD* and pTarget-*HA-CASP-2L-Pro*, as indicated. Co-immunoprecipitation experiments (IP) on transfected Namalwa cells were performed with anti-Flag or anti-HA antibodies, as indicated, and blotiing was revealed by anti-Flag antibodies followed by enhanced chemiluminescence. In the control (C), IP were undertaken by anti-HA antibodies and A/G Sepharose beads.

C) Namalwa cells were transiently transfected by electroporation with empty pTarget or co-transfected with pTarget-*HIS-CASP-2L* and pTarget-*HA-CASP-2L-Pro*. Immunoprecipitation experiments (IP) were performed by anti-HA antibodies (HA), and blotting was revealed by anti-caspase-2 antibodies followed by enhanced chemiluminescence. In the control (C), IP were conducted with anti-HA antibodies (diluted) and A/G Sepharose beads.

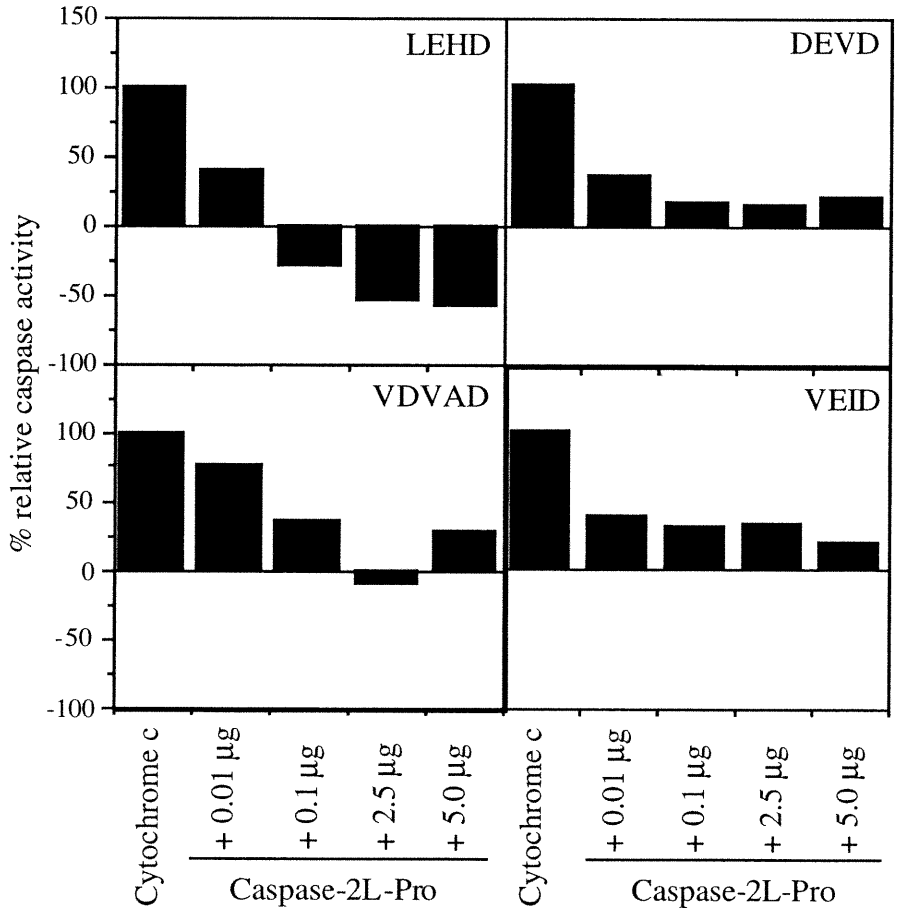


Figure. 4 Caspase-2L-Pro interferes with caspase activities in a cell-free system assay.

U937 cell-free extracts were incubated with cytochrome c/dATP in the absence or presence of different amounts of purified recombinant caspase-2L-Pro protein. Cleavage of Ac-LEHD-AFC (caspase-9 substrate), Ac-DEVD-AMC (caspase-3, -7 and -2L substrates), z-VDVAD-AFC (caspase-2L substrate) and Ac-VEID-AFC (caspase-6 substrate) was monitored. Enzyme activities were determined as initial velocities expressed as relative intensity / min / mg, and the results expressed as percent relative enzyme activity according to the formula *[(Vi-Vo / Va-Vo) X 100]* where *Vi* is the initial velocity measured in activated extract in the presence of various fixed amounts of inhibitors, *Vo* is the basal initial velocity measured in unactivated control extract, and *Va* is the initial velocity measured in activated extracts in the absence of inhibitors. *Data points* are representative of 2 independent experiments.

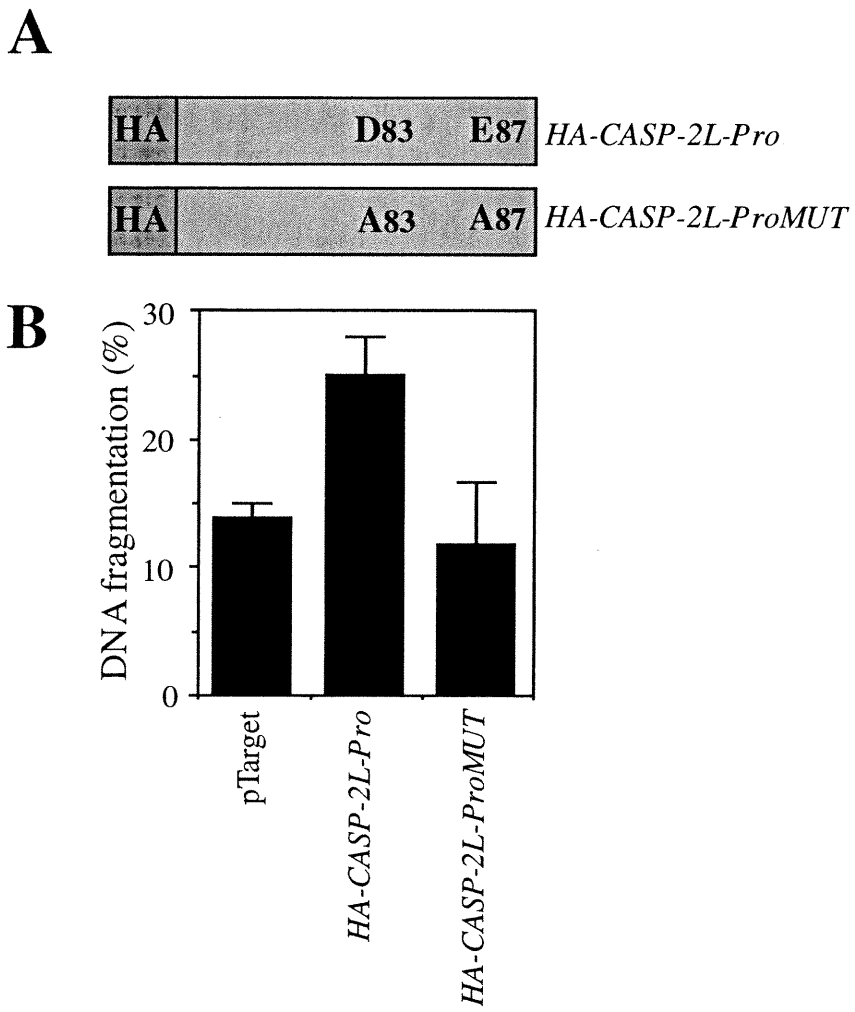


Figure. 5 Transient expression of caspase-2L-Pro induces apoptosis.

A) Schematic representation of HA-caspase-2L-Pro and HA-caspase-2L-ProMut carrying D83A and E87A.
B) Namalwa cells were transfected with pTarget, pTarget-*HA-CASP-2L-Pro* or pTarget-*HA-CASP-2L-ProMut* and DNA fragmentation was quantitated by filter DNA elution assays 48 h after transfection. The results are expressed as percent DNA fragmentation. *Data points* are the means of 3 independent experiments (n=9); *bars*, SD.

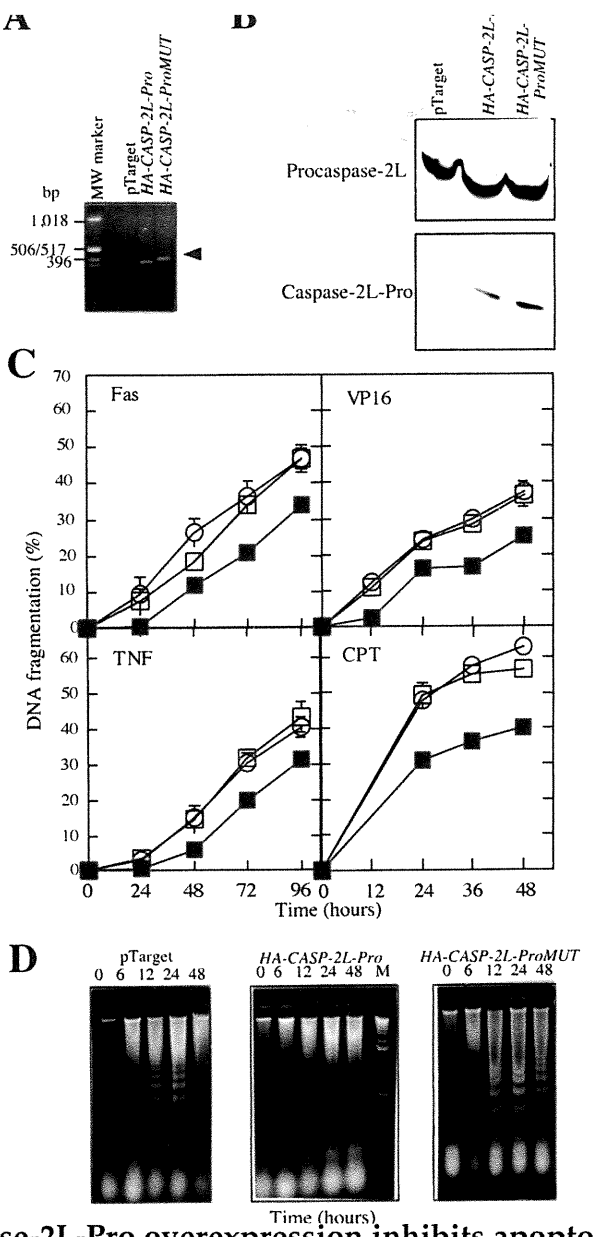


Figure. 6 Caspase-2L-Pro overexpression inhibits apoptosis induced by different stimuli. Stable Namalwa variant cells transfected with empty, *HA-CASP-2L-Pro* and *HA-CASP-2L-ProMut* vectors were selected as bulk culture under 1500 μg/ml geneticin, as indicated.

A) PCR analysis of genomic DNA showing *HA-CASP-2L-Pro* and *HA-CASP-2L-ProMut* insertion in these mixed cell populations.

B) Western blot analysis of procaspase-2L, HA-caspase-2L-Pro and HA-caspase-2L-ProMut expression in these mixed cell populations. Proteins were detected by caspase-2 polyclonal antibodies and revealed by enhanced chemiluminescence.

C) Kinetics of DNA fragmentation were monitored by filter DNA elution assay in cells treated continuously with 50 ng/ml Fas mAb and 0.8 mg cycloheximide (upper left panel) or 50 ng/ml TNF-α and 0.8 μg cycloheximide (lower left panel), or after 30-min treatment with 20 μM VP16 (upper right panel) or 1.0 μM CPT (lower right panel). The results are expressed as percent DNA fragmentation. *Data points* are the means of two independent experiments (n=6); *bars*, SD. *Symbols* are for pTarget (○), pTarget-*HA-CASP-2L-Pro* (■) and pTarget-*HA-CASP-2L-ProMut* (□) Namalwa variant cells selected under 1.5 mg/ml geneticin.

D) Agarose gel electrophoresis of DNA extracted at the indicated times after VP16 treatment (20 μM, 30 min), from pTarget, pTarget-*HA-CASP-2L-Pro* and pTarget-*HA-CASP-2L-ProMut* Namalwa variant cells selected under 1.5 mg/ml geneticin.

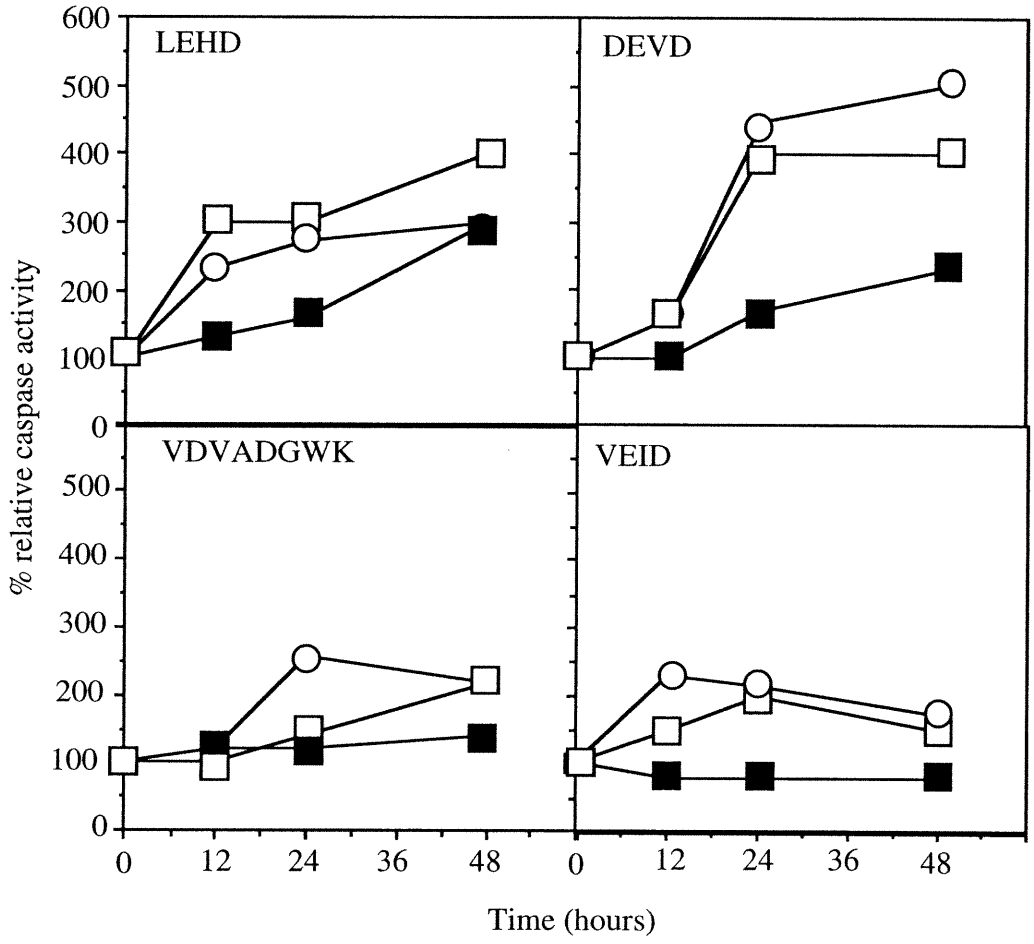


Figure. 7 Kinetics of caspase activities after VP16 treatment.

The kinetics of Ac-LEHD-AFC (caspase-9 substrate), Ac-DEVD-AMC (caspase-3, -7 and -2L substrate), MCA-VDVADGWK(DNP)-NH2 (caspase-2L substrate) and Ac-VEID-AFC (caspase-6 substrate) hydrolysis were monitored at the indicated times after VP16 treatment (20 μM, 30 min). Enzyme activities were determined as initial velocities expressed as relative intensity/min/mg and the results expressed as percent relative enzyme activity according to the formula *[(Vt / Vo) X 100]* where *Vt* is the initial velocity measured in cell extracts prepared at specified times after drug treatment, and *Vo* is the initial velocity measured in cell extracts prepared from untreated control cells. *Data points* are representative of 2 independent experiments . *Symbols* are for pTarget (○), pTarget-*HA-CASP-2L-Pro* (■) and pTarget-*HA-CASP-2L-ProMut* (□) Namalwa variant cells selected under 1.5 mg/ml geneticin.

CHAPITRE 6 DISCUSSION, PERSPECTIVES & CONCLUSIONS

6.1 - Rôle des différentes isoformes de la caspase-2 dans l'apoptose

La caspase-2 occupe une place à part au sein de la famille des caspases. Par sa structure, comportant un long prodomaine contenant un CARD, elle s'apparente aux caspases initiatrices. Cependant, alors que la délétion du gène codant pour d'autres caspases initiatrices comme la caspase-8 ou la caspase-9 a des conséquences majeures sur le développement des souris (Varfolomeev *et coll.*, 1998; Hakem *et coll.*, 1998; Kuida *et coll.*, 1998), celui de la caspase-2 n'a aucun retentissement significatif sur leur développement (Bergeron *et coll.*, 1998). L'identification d'une interaction possible entre la procaspase-2 et l'adaptateur RAIDD a suggéré que la caspase-2 pourrait être la caspase initiatrice dans la voie de signalisation de l'apoptose induite par le TNF (Duan & Dixit, 1997). Cependant, l'analyse des souris caspase-2 -/- n'a pas identifié de retentissement spectaculaire de sa délétion sur la signalisation induite par cette cytokine. La caspase-2 ne semble pas non plus impliquée dans la réponse inflammatoire en contrôlant la maturation des cytokines comme les caspases 1 et 11. Comme plusieurs autres enzymes de la famille des caspases, la caspase-2 est activée au cours de l'apoptose induite par divers stimuli dans des cellules d'origine diverse (Harvey *et coll.*, 1997; Swanton *et coll.*, 1999; Van de Craen *et coll.*, 1999). Dans un extrait cytosolique de cellules Jurkat traité par cytochrome c en présence d'ATP, l'activation de la caspase-2 semble ne survenir qu'en fin de cascade protéolytique (Slee *et coll.*, 1999). L'existence d'une isoforme longue dont la surexpression peut induire l'apoptose, et d'une isoforme courte dont la surexpression peut freiner l'apoptose, complique davantage l'étude de cette enzyme (Wang *et coll.*, 1994). La place exacte de la caspase-2 et de ses différentes isoformes reste donc à être identifiée.

Le travail que nous avons réalisé identifie quelques pistes susceptibles d'expliquer le rôle de cette enzyme. Nous avons d'abord été intrigué par la capacité des agents cytotoxiques à stimuler la transcription du gène *CASP-2* et particulièrement de l'isoforme courte *CASP-2S*. Nous avons ensuite

montré que les isoformes longue et courte de la caspase-2 ainsi qu'une nouvelle isoforme, caspase-2L-Pro, pouvaient moduler l'apoptose induite par différents stimuli. Nos principales conclusions peuvent se résumer de la façon suivante :

1) La procaspase-2L intervient dans l'apoptose des cellules leucémiques humaines induite par l'engagement de Fas en favorisant l'activation de la procaspase-8 sans interagir directement avec les éléments constitutifs du DISC.

2) Au cours de l'apoptose des cellules U937 traitées par étoposide, l'effet antiapoptotique de la procaspase-2S est limité à certains aspects phénotypiques de la mort cellulaire, en particulier à l'externalisation des phosphatidylsérines et à la formation des corps apoptotiques. La cystéine du motif QACRG de la procaspase-2S semble nécessaire à cet effet qui pourrait impliquer une inhibition, directe ou indirecte, de l'isoforme longue par l'isoforme courte.

3) Il existe d'autres isoformes de la caspase-2, en particulier une isoforme très courte dénommée caspase-2L-Pro qui correspond essentiellement au domaine CARD délété de sa sixième hélice alpha. Comme la procaspase-2L, la caspase-2L-Pro interagit avec la procaspase-2L et avec l'adaptateur RAIDD. Cette isoforme freine l'apoptose induite par Fas, par le TNF-α, par l'étoposide et par la camptothécine. Ce rôle anti-apoptotique est inhibé par la double mutation F80A / D83A qui, au niveau du prodomaine de la procaspase-2L, prévient l'interaction avec RAIDD. Ce résultat suggère que l'interaction de caspase-2L-Pro avec une autre molécule est nécessaire à son effet anti-apoptotique. Cette interaction pourrait être inhibitrice en prévenant, par compétition, d'autres interactions, par exemple celle du prodomaine de la procaspase-2L avec RAIDD, avec une autre molécule de procaspase-2L ou avec une autre molécule.

Ainsi, la procaspase-2 apparaît comme une enzyme qui n'est pas indispensable au développement ni à l'apoptose mais qui intervient de

manière subtile dans certains aspects de la mort cellulaire en accélérant ou en freinant le processus en fonction de l'isoforme synthétisée.

6.1.1 - L'isoforme longue de la caspase-2 intervient dans l'apoptose induite par l'engagement du récepteur Fas.

La caspase-2L ne semble pas indispensable à l'apoptose induite par engagement du récepteur Fas : les lymphocytes des souris caspase-2 -/- restent sensibles à cette forme d'apoptose et ces animaux ne développent pas de maladie auto-immune, contrairement à ceux présentant une mutation de Fas (souris lpr; Nagata & Suda, 1995, pour revue) ou de son ligand (souris gld; Nagata & Suda, 1995, pour revue). Cependant, la sensibilité des lymphocytes à l'apoptose dépendant de Fas est décrite dans l'article de Bergeron *et coll.* (1998) sans figure ni information précise sur le stimulus utilisé (anticorps agonistes ? ligand naturel ?) ni sur la manière dont l'apoptose a été étudiée. De plus, les animaux *lpr* ou *gld* sont des variants de la souche MRL qui présente spontanément une sensibilité importante aux maladies auto-immunes alors que les souris utilisées pour tester les effets de la délétion génique sont de la souche SOD. La délétion du gène *CASP-2* chez les souris MRL pourrait permettre de préciser si le rôle de la caspase-2L est décisif dans l'apoptose Fas-dépendante en étudiant l'influence de la délétion sur la vitesse d'apparition des manifestations auto-immunes.

Les résultats que nous avons obtenus en réduisant l'expression de la caspase-2L par transfection stable d'une construction antisens dans les lignées U937, Jurkat et CEM suggèrent l'intervention de cette isoforme de la caspase-2 dans la voie Fas et, probablement, dans l'apoptose induite par l'intermédiaire d'autres récepteurs à domaine de mort. La caspase-2 intervient à une étape précoce de la voie d'activation de la mort apoptotique puisque son effet se situe en amont du relargage mitochondrial de cytochrome c et de l'activation de la caspase-3. Nos résultats indiquent que la caspase-2 participe à l'activation des voies de signalisation conduisant à l'apoptose après engagement du récepteur à domaine de mort en favorisant l'activation de la procaspase-8. La caspase-8 va le plus souvent cliver la

protéine Bid , laquelle, en association avec Bax, semble capable d'induire la libération du cytochrome c par la mitochondrie (Eskes *et coll.*, 2000).

Nous avons rappelé en introduction les molécules impliquées dans la signalisation de la mort cellulaire à partir des récepteurs à domaine de mort. Pour mémoire, l'engagement du récepteur oligomérisé provoque le recrutement d'une molécule adaptatrice, FADD, laquelle recrute des molécules de procaspase-8 qui sont activées. Cependant, le mécanisme de l'activation de la procaspase-8 au sein du complexe récepteur / molécule adaptatrice / procaspase reste mal compris. Pour expliquer comment la caspase-2L favorise l'activation de la procaspase-8, deux hypothèses peuvent être envisagées : soit la caspase-2L interagit directement avec une ou plusieurs des molécules constituant le DISC, soit elle favorise indirectement l'activation de la caspase-8 au sein du DISC.

La première hypothèse semble devoir être écartée puisque nous n'avons pas identifié d'interaction entre la procaspase-2L et Fas ou FADD ou la procaspase-8. D'ailleurs, la procaspase-2L n'a jamais été identifiée dans les complexes formés en réponse à l'engagement de Fas. La procaspase-2L interagit avec la molécule adapatatrice RAIDD / CRADD, au moins lorsque les deux molécules sont artificiellement surexprimées dans des cellules par transfection transitoire (Duan & Dixit, 1997; Ahmad *et coll.*, 1997). Cette molécule adapatrice connecte éventuellement la procaspase-2L à la voie TNF-R1 puisque RAIDD / CRADD peut intergir avec TNF-R1 via la molécule RIP (toujours dans des systèmes de surexpression artificielle par transfection transitoire) mais l'importance physiologique de cette voie d'activation n'a jamais été établie.

La seconde hypothèse est celle d'un rôle indirect de la caspase-2L sur la formation du DISC. Une nouvelle molécule intervenant dans la formation du DISC, dénommée FLASH, a été identifiée. Elle pourrait interagir avec la procaspase-8 et avec FADD (Imai *et coll.*, 1999). Cette interaction serait nécessaire à l'activation de la procaspase-8 dans l'apoptose dépendant de Fas. On peut imaginer que la réduction de l'expression de la procaspase-2L

modifie cette interaction, expliquant la diminution de l'activation de la procaspase-8.

Un autre mécanisme indirect par lequel la caspase-2L pourrait influencer la voie de signalisation conduisant à la mort cellulaire à partir de Fas implique le clivage d'une protéine intracellulaire libérant un fragment protéique qui va contribuer à la formation du DISC ou, au moins, à l'activation de la caspase-8 au sein de ce complexe. La Golgine-160 est la seule protéine identifiée comme étant une cible privilégiée de la caspase-2L (Mancini *et coll.*, 2000). Cependant, la caspase-2L, au moins *in vitro*, est capable, avec d'autres caspases, de cliver plusieurs autres protéines. L'une de ces protéines clivables par la caspase-2L *in vitro* est la molécule c-FLIP.

c-FLIP est une protéine de 55 kDa dont la stucture s'apparente à celle de la procaspase-8 mais qui ne possède pas de site catalytique actif du fait de l'absence de cystéine au sein du motif consensus QACXG. Le rôle de cette molécule a été très controversé. Certains, sur la base d'expérience de surexpression intense et transitoire, ont décrit c-FLIP comme une molécule pro-apoptotique, cette apoptose pouvant être prévenue par un mutant dominant-négatif de la caspase-8, par les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et par des inhibiteurs des caspases (Goltsev *et coll.*, 1997; Inohara *et coll.*, 1997; Han *et coll.*, 1997; Rasper *et coll.*, 1998). D'autres auteurs ont décrit c-FLIP comme une molécule anti-apoptotique capable d'inhiber, peut être en prenant sa place au sein du DISC, l'activation de la procaspase-8 (Irmler *et coll.*, 1997; Hu *et coll.*, 1997a; Hu *et coll.*, 1997b; Srinivasula *et coll.*, 1997; Kataoka *et coll.*, 1998; Scaffidi *et coll.*, 1999; Leverkus *et coll.*, 2000). Du fait de sa structure de fausse procaspase-8, l'effet anti-apoptotique de c-FLIP paraît le plus probable.

Au cours de l'apoptose, on observe un clivage de c-FLIP en fragments de 43 et 12 kDa. Des expériences *in vitro* ont montré que c-FLIP était clivable par des caspases, en particulier au niveau d'une séquence LEVD / G. Toujours *in vitro*, la caspase-2L comme la caspase-8 peuvent réaliser ce clivage qui, pour certains, serait nécessaire à son activité anti-apoptotique

(Scaffidi *et coll.*, 1999) alors que, pour d'autres, il supprimerait cet effet (Perlman *et coll.*, 1999; Wang *et coll.*, 2000). Nous avons observé que la diminution de l'expression de la procaspase-2L retardait le clivage de c-FLIP en réponse à l'engagement de Fas. Deux mécanismes peuvent expliquer cette observation :

- La caspase-8 est la principale caspase responsable du clivage de c-FLIP dans les cellules. Le retard du clivage de c-FLIP est une des conséquences d'un retard d'activation de la caspase-8 en réponse à l'engagement de Fas. Dans cette hypothèse, le clivage de c-FLIP n'est pas le médiateur de l'effet pro-apoptotique de la caspase-2L dans l'apoptose Fas-dépendante.

- La caspase-2L est la principale caspase responsable du clivage de c-FLIP dans les cellules. Le retard du clivage de c-FLIP est alors la conséquence directe de la diminution de l'expression de la caspase-2L par transfection stable de la construction antisens. Dans cette hypothèse, c'est le retard du clivage de c-FLIP induit par la diminution de l'expression de la caspase-2L qui explique le retard de l'apoptose médiée par Fas.

Pour distinguer ces deux hypothèses, on pourrait d'abord étudier le clivage de c-FLIP en réponse à l'engagement de Fas dans des cellules caspase-8 -/-. Si le clivage est observé, c'est que la caspase-8 n'est pas indispensable à ce clivage. La même expérience mériterait d'être réalisée dans des cellules de souris caspase-2 -/-. En outre, on pourrait étudier les conséquences de la diminution de l'expression de la caspase-2L (par transfection stable de la construction antisens) dans les cellules caspase-8 -/- sur le clivage de c-FLIP en réponse à l'engagement de Fas. La diminution du clivage de c-FLIP en réponse à l'engagement de Fas dans ce modèle serait un argument important en faveur du rôle de la caspase-2L dans l'activation de la voie Fas via le clivage de cette protéine.

La diminution de l'expression de l'isoforme longue de la caspase-2 par transfection stable d'une construction antisens semble également interférer avec l'apoptose médiée par TRAIL. Cet observation est compatible avec l'hypothèse précédemment décrite d'une influence de la caspase-2L sur le clivage de c-FLIP puisque c-FLIP est également décrit comme un inhibiteur de la mort cellulaire induite par l'engagement des récepteurs DR4 et DR5 de TRAIL (Kim *et coll.*, 2000). Elle suggère que la caspase-2 pourrait être requise pour accélérer l'apoptose médiée par divers récepteurs à domaine de mort. La signification physiologique de cette observation reste mystérieuse.

Le rôle de l'isoforme longue de la caspase-2 dans l'apoptose induite par les agents cytotoxiques reste à définir. L'étude des souris caspase 2 -/- a montré une résistance des ovocytes à l'apoptose induite par une anthracycline (Bergeron *et coll.*, 1998). Il semble que cette résistance soit spécifique des cellules étudiées. Le modèle des cellules leucémiques transfectées par une contruction caspase-2L antisens n'a pas permis d'étudier l'influence de la caspase-2L sur l'apoptose induite par un agent cytotoxique, par exemple, par l'étoposide, du fait de l'accumulation transcriptionnelle du gène *CASP2* sous l'effet de l'agent cytotoxique.

6.1.2 - L'isoforme courte de la procaspase-2, procaspase-2S, interfère avec certains aspects phénotypiques de la mort cellulaire par apoptose.

Dès son identification, l'isoforme courte de la procaspase-2 (Ich-1S) a été présentée comme une isoforme anti-apoptotique. Sa surexpression, non seulement n'induit pas l'apoptose comme le fait la surexpression de l'isoforme longue, mais aussi protège des cellules Rat-1 de l'apoptose induite par privation de sérum (Wang *et coll.*, 1994). Cette protection a été évaluée par une étude morphologique associée à celle de l'exclusion du bleu trypan. Elle recouvre donc nos donnée puisque l'analyse morphologique des cellules U937 surexprimant de manière transitoire ou stable la caspase-2S montre un retard à l'apoptose induite par l'étoposide par rapport aux cellules contrôles.

Cependant, en utilisant de multiples paramètres distincts pour étudier l'apoptose des cellules U937 exposées à l'étoposide, nous avons observé que la surexpression de l'isoforme courte de la caspase-2 influencait principalement deux marqueurs de la mort apoptotique : l'externalisation des phosphatidylsérines et la formation des corps apoptotiques. Par contre, la surexpression de la caspase-2S n'a aucun effet sur la fragmentation internucléosomale de l'ADN ni sur l'activation de la plupart des autres caspases, à l'exception de la caspase-2L.

La surexpression de la procaspase-2S intervient surtout au niveau des évènements membranaires que sont l'externalisation de la phosphatidylsérine et la formation des corps apoptotiques, deux évènements qui jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance et l'ingestion des cellules apoptotiques par les cellules phagocytaires. L'asymétrie des lipides membranaires est normalement maintenue par une ATPase appelée aminophospholipides translocase qui transporte la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane plasmique. Une autre enzyme appelée scramblase a l'effet inverse en catalysant les mouvements bidirectionnels des phospholipides dans la membrane plasmique. L'apoptose des lymphocytes T s'accompagne d'une inhibition de la translocase et d'une activation simultanée de la scramblase (Verhoven *et coll.*, 1999). L'activation de la scramblase semble impliquer l'isoforme δ de la protéine kinase C (Frasch *et coll.*, 2000). La sensibilité de l'externalisation des phosphatidylsérines aux inhibiteurs des caspases dépend du modèle cellulaire et du stimulus utilisé (Verhoven *et coll.*, 1999). Dans les cellules U937 exposées à l'étoposide, l'externalisation des phosphatidylsérines est sensible aux inhibiteurs de caspases tels que z-VAD-fmk (données non publiées), ce qui suggère que la procaspase-2S interfère avec la ou les enzymes impliquées dans cette externalisation. On ne peut exclure, cependant, que la procaspase-2S interfère avec d'autres acteurs impliqués dans ces changements membranaires, par exemple une isoenzyme de la famille des protéines kinases C.

Les caspases sont impliquées également dans la formation des corps apoptotiques (Zhang *et coll.*, 1999). Celle-ci fait suite à la condensation des cellules qui implique elle-même des mouvements ioniques, en particulier un efflux de Na^+ et de K^+ par différentes pompes membranaires dont l'inhibition prévient la formation des corps apoptotiques (Mc Carthy & Cotter, 1997). Il serait utile de déterminer si l'effet de la surexpression de la caspase-2S sur la formation des corps apoptotiques résulte d'une interférence avec les mouvements ioniques déclenchés par l'apoptose, par exemple en clivant une protéine telle qu'une pompe membranaire impliquée dans ces mouvements ioniques.

Nous avons tenté de mieux comprendre la capacité de la caspase-2S à interférer avec l'activation des autres caspases. Pour cela, nous avons produit et purifiée la caspase-2S recombinante sous forme de procaspase-2S puis nous l'avons incubée avec un extrait cytosolique de cellules U937 contrôles en présence de cytochrome c et de dATP. L'addition de procaspase-2S freine, de manière dépendante de la dose, l'activation de toutes les autres caspases étudiées (activation mesurée à l'aide de substrats synthétiques par méthode fluorescente ou colorimétrique). Cependant, les concentrations de procaspase-2S requises pour observer un effet inhibiteur dans ce système sont très au dessus des concentrations d'enzyme qu'il est possible d'atteindre dans une cellule. La relevance de cette observation est donc difficile à évaluer. Peut être aurait-il été préférable d'utiliser la caspase-2S recombinante plutôt que sa proforme. L'utilisation de la proforme implique son activation par clivage dans la cascade protéolytique conduisant à l'apoptose. Rien ne permet de déterminer, à l'heure actuelle, si la procaspase-2S est activée en aval des évènements mitochondriaux, au sein de la cascade protéolytique activée par le cytochrome c, ou en amont de la mitochondrie, participant à la régulation des évènements mitochondriaux.

Une protéine interagissant avec la procaspase-2S a été récemment identifiée. Il s'agit d'ISBP (« *Ich-1S (Caspase-2S)-binding Protein* ») (Ito *et coll.*, 2000) qui interagit avec la procaspase-2S par l'intermédiaire des 19 acides aminés carboxy-terminaux spécifiques de la caspase-2S (leur spécificité

vient de la délétion de 61 paires de bases, se trouvant juste après le site catalytique). Il serait intéressant de déterminer si ISBP est exprimé dans les cellules U937, s'il interagit effectivement avec la procaspase-2S dans ces cellules et les conséquences de cette interaction (par exemple en mutant le site d'interaction sur la procaspase-2S).

Les conséquences de la mutation de la cystéine du motif consensus QACRG de la caspase-2S, qui suppriment sa capacité à inhiber certains aspects phénotypiques de l'apoptose, suggèrent que la séquence QACRG est impliquée dans cet effet inhibiteur. Gu *et coll.* (1995) ont montré que les sous-unités longue et courte de différentes procaspases pouvaient s'hétérodimériser, au moins *in vitro*, dans un système acellulaire. On peut émettre l'hypothèse selon laquelle la procaspase-2S, qui n'a pas de petite sous-unité, interagit avec la petite sous-unité d'une autre caspase. Ses effets sur l'apoptose sont alors la conséquence du clivage d'un substrat à identifier. Si, le plus souvent, le clivage d'une protéine au cours de l'apoptose contribue au processus de mort cellulaire, il arrive que ce clivage freine la mort cellulaire comme nous l'avons montré à propos de la protéine $p27^{Kip1}$ (Eymin *et coll.*, 1999).

6.1.3 - Une isoforme de la caspase-2 nouvellement identifiée, la caspase-2L-Pro, freine l'apoptose induite par divers stimuli.

La surexpression transitoire de l'isoforme très courte de la caspase-2 que nous avons identifiée et dénommée caspase-2L-Pro a également un effet anti-apoptotique vis à vis de nombreux stimuli. Cette isoforme mime le prodomaine de la procaspase-2L dont on sait l'importance pour l'oligomérisation et l'autoactivaion de la molécule, pour sa migration du cytosol vers le noyau, pour la formation de filaments en interagissant avec le domaine CARD d'autres molécules comme RAIDD. Il est donc probable que les effets de la surexpression de l'isoforme caspase-2L-Pro sont la conséquence de l'interférence de cette isoforme avec les interactions multiples du prodomaine de la procaspase-2L. En faveur de cette hypothèse, la double mutation de caspase-2L-Pro qui reproduit celle altérant

l'interaction RAIDD / procaspase-2L supprime l'effet inhibiteur de la surexpression de cette isoforme.

6.1.4 - Le rôle physiologique des différentes isoformes de la caspase-2 est encore mal défini.

Les résultats de nos travaux sur les différentes isoformes de la caspase-2 révèlent quelques contradictions, au moins en apparence. Par exemple, la surexpression de la procaspase-2S n'altère que quelques aspects phénotypiques de la mort cellulaire tout en freinant, semble t-il de manière assez spécifique, l'activation de la procaspase-2L. Or, la diminution de l'expression de la procaspase-2L prévient tous les aspects phénotypiques de l'apoptose dans des cellules traitées par l'agoniste d'une récepteur à domaine de mort. Cette contradiction est probablement du au fait que la procaspase-2L peut intervenir à différents niveaux : très en amont dans les voies d'activation mises en jeu par les récepteurs à domaine de mort et beaucoup plus en aval dans les voies d'activation mises en jeu par les agents cytotoxiques. C'est dans ce dernier cas que la caspase-2L ne semble impliquée que dans certains aspects phénotypiques de la mort cellulaire. Dans tous les cas, les interactions du prodomaine avec d'autres protéines sont probablement importantes puique l'isoforme caspase-2L-Pro a un effet inhibiteur sur les différentes voies d'activation.

Un autre point que nous n'avons pas pris en considération est la localisation subcellulaire des différentes isoformes de la procaspase-2. La procaspase-2L a été localisée dans le cytosol, l'espace intermembranaire mitochondrial, le noyau et l'appareil de Golgi, suggérant que cette enzyme a des cibles dans ces différents compartiments (Susin *et coll.*, 1999b; Colussi *et coll.*, 1998a; Mancini *et coll.*, 2000). La transfection des différentes isoformes de la caspase-2 couplées à un marqueur permettant leur identification, par exemple la GFP, pourrait permettre de mieux comprendre comment elles se répartissent dans la cellule transfectée.

La signification physiologique de l'existence des différentes isoformes des caspases, qu'il s'agisse de la caspase-2 ou d'autres caspases, reste à déterminer. Ces isoformes pourraient intervenir à différents stades du développement dans des tissus spécifiques, comme le suggère l'étude des souris caspase 2 -/- (déficit en neurones faciaux ou accumulation d'ovocytes par exemple). Dans les cellules adultes, elle pourrait intervenir dans la mort cellulaire de manière spécifique de la cellule et du stimulus apoptotique auquel cette cellule est exposée. Enfin, il est possible que certaines isoformes de la caspase-2 aient un rôle dans d'autres processus biologiques, par exemple dans la différenciation cellulaire (Sordet *et coll.*, résultats non publiés).

6.2 - Régulation transcriptionnelle des messagers *CASP*

Nous avons observé que les agents cytotoxiques comme l'étoposide induisaient une augmentation de la transcription de gènes *CASP* dans les cellules leucémiques et dans les cellules cancéreuses coliques humaines. Le cisplatine, la doxorubicine et la mitomycine C induisent également une accumulation des procaspases-2, -3 et -8 ainsi que de la molécule adaptatrice FADD dans les cellules tumorales avant qu'elles n'entrent en apoptose (Micheau O *et coll.*, 1999). Les agents cytotoxiques sont capables d'induire la transcription d'autres gènes, en particulier de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme cellulaire comme *c-fos* (Kharbanda S *et coll.*, 1991), *c-jun* (Rubin *et coll.*, 1991), *gadd153* (Eymin *et coll.*, 1997) ou *Fas-L* (Kasibhatla *et coll.*, 1998).

Une augmentation des messagers des gènes *CASP* a été observée dans d'autres systèmes. La transcription du gène *Nedd2* augmente dans un modèle *in vivo* de mort cellulaire neuronale (Kinoshita *et coll.*, 1997). Des antagonistes de la thromboxane A_2 provoquent une accumulation de la procaspase-2L qui sensibilise les cellules de cancer du poumon à l'apoptose induite par le cisplatine (Fujimura *et coll.*, 1999) tandis que l'IFN-γ stimule la transcription des gènes *CASP-1, -3, -4, -7, -8* et *-10* (Tamura *et coll.*, 1996; Ossina *et coll.*, 1997) et que le TNF stimule celle de l'isoforme c de la caspse-

10 (Ng *et coll.*, 1999). Par contre, l'engagement du récepteur Fas n'a aucun effet sur la transcription des gènes *CASP* (Micheau *et coll.*, 1999b). La réponse transcriptionnelle dépend donc du stimulus dans un système cellulaire donné. Il est intéressant de noter que l'exposition des cellules tumorales à un agent cytotoxique, en provoquant l'accumulation, dans la cellule, des divers acteurs moléculaires de la voie Fas, sensibilise ces cellules tumorales aux agonistes de ce récepteur (Micheau *et coll.*, 1997).

Nos résultats suggèrent une relation entre la capacité d'un agent cytotoxique à stimuler la transcription de certains gènes *CASP* (et la synthèse des protéines correspondantes) et la mort cellulaire induite par cet agent cytotoxique. Cette régulation transcriptionnelle n'est pourtant pas indispensable à la mort cellulaire puisque l'actinomycine D, un agent qui inhibe la transcription génique, ainsi que le cycloheximide et la puromycine qui inhibent la synthèse protéique, n'inhibent pas l'apoptose induite par les agents cytotoxiques (Eymin *et coll.*, 1997) et parfois même l'induisent eux-mêmes (Martins *et coll.*, 1997).

Il est actuellement difficile de se faire une idée de l'importance réelle de la régulation transcriptionnelle des gènes *CASP* dans la réponse des cellules tumorales aux agents cytotoxiques. Il est tentant de spéculer que, avant de déclancher la machinerie apoptotique, la cellule accumule tous les éléments nécessaires au bon fonctionnement de cette machinerie. La synthèse simultanée de la procaspase-2L et de la procaspase-3 d'une part, de la procaspase-2S et de caspase-2L-Pro d'autre part, suggère que la cellule fabrique simultanément des acteurs moléculaires de l'apoptose et des inhibiteurs endogènes pour contrôler le phénomène.

La capacité de Bcl-2 à prévenir l'activation transcriptionnelle des gènes *CASP* est intriguante. Le principal mécanisme par lequel Bcl-2 est supposé interférer avec l'apoptose est l'inhibition de la libération des molécules proapoptotiques d'origine mitochondriale (Chinnayian *et coll.*, 1996). Notre observation suggère que Bcl-2 prévient l'activation des facteurs de transcription impliqués dans l'expression des messagers *CASP*. Afin de

mieux comprendre le sens et le mécanisme de cette inhibition, il est nécessaire de mieux comprendre la régulation transcriptionnelle des gènes *CASP*.

L'accumulation d'un facteur de transcription au cours de l'apoptose ne signifie pas que ce facteur est impliqué dans la régulation transcriptionnnelle de gènes cibles. Il a été montré que le facteur de transcription TR3, qui est un récepteur orphelin, s'accumule dans les cellules LNCaP exposées à certains agents inducteurs d'apoptose dont l'étoposide, est transloqué du noyau vers la mitochondrie et induit le relargage du cytochrome c (Li *et coll.*, 2000). La protéine TR3 exerce donc dans le cytosol une fonction très distincte de celle qu'elle exerce quand elle est dans le noyau.

Les fibroblastes de souris STAT-1 -/- expriment moins de procaspases-1, -2 et -3 (Kumar *et coll.*, 1997), suggérant que ce facteur de transcription est impliqué dans la transcription des gènes *CASP-1*, *-2* et *-3*. STAT-1 doit être phosphorylée au niveau de la tyrosine 701 pour se dimériser et stimuler la transcription de ses gènes cibles. Il a été montré que STAT1 était impliqué dans la régulation de l'expression du gène *CASP-1* par l'EGF et l'IFN-γ (Chin *et coll.*, 1997). King & Goodbourn (1998) ont montré que STAT-1 était clivé par les caspases en aval de la tyrosine 701 ce qui avait pour conséquence d'empêcher sa phosphorylation et son activation (Figure 25). Ces résultats suggèrent donc que certaines caspases seraient capables de réguler leur propre transcription via STAT-1.

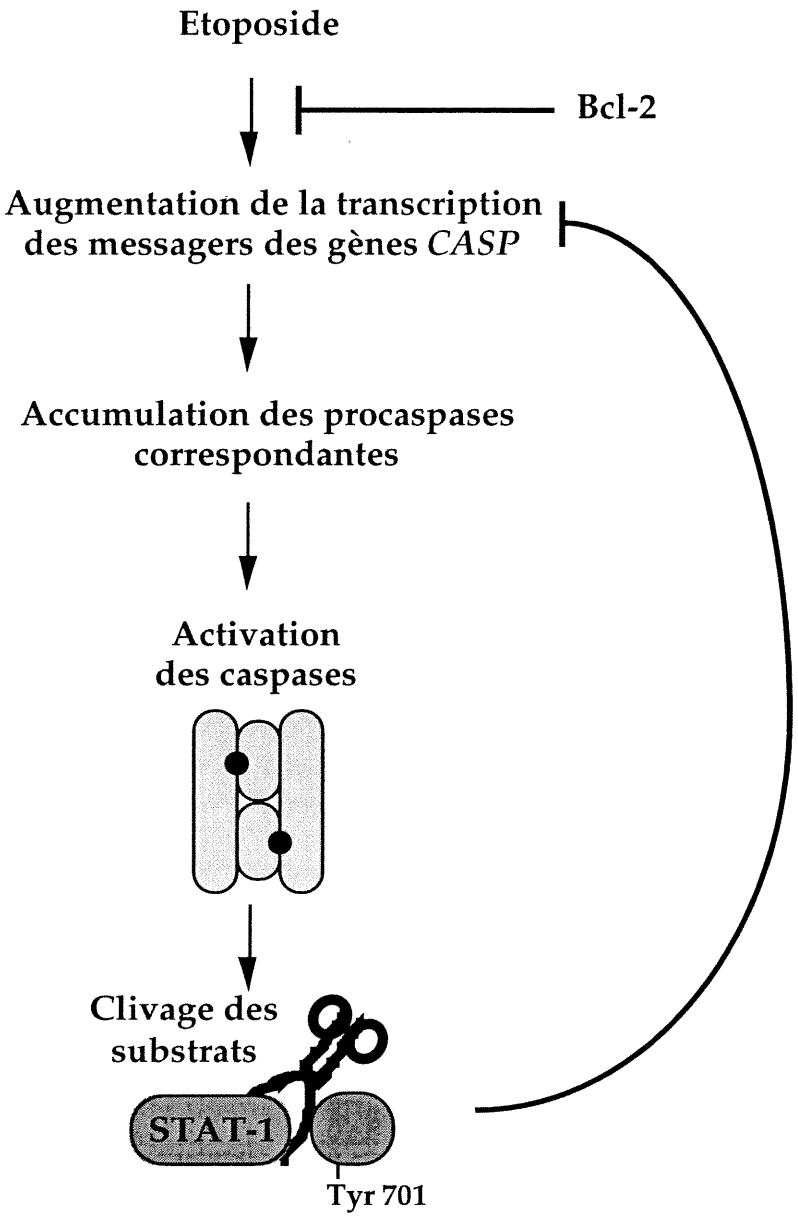


Figure 25: Mécanisme de régulation hypothétique de STAT-1 par les caspases.

Comme TR3 précédemment décrit, STAT1 n'est pas seulement un facteur de transcription. Dans les cellules HeLa, STAT1 interagit avec le récepteur TNF-R1 et cette interaction augmente sous l'effet du TNF-α. Du fait de cette association, STAT1 perd sa fonction de facteur de transcription puiqu'il ne peut plus migrer dans le noyau (Wang *et coll.*, 2000). Dans les souris déficientes en STAT1, le TNF-α stimule la dégradation de IκB et l'activation de NF-κB. Dans les cellules 293T, la surexpression de STAT1 bloque l'activation de NF-κB par le TNF-α. STAT1 favorise donc l'apoptose

induite par le TNF-α en prévenant l'activation de NF-κB (Wang *et coll.*, 2000).

L'accumulation des procaspases-3 et -8 dans les cellules de cancer colique induite par des agents cytotoxiques semble être indépendante de STAT-1 (Micheau *et coll.*, 1999b). D'autres facteurs de transcription sont donc impliqués dans la réponse transcriptionnelle aux agents cytotoxiques. Cette régulation transcriptionnelle pourrait être mise à profit pour optimiser la chimiothérapie séquentielle, un premier agent provoquant l'accumulation des caspases pour permettre au second agent de mieux tuer les cellules.

La régulation transcriptionnelle des gènes *CASP* est encore très mal connue. Au sein du laboratoire, l'équipe de Laurent Corcos a entrepris le clonage du promoteur du gène *CASP-2*. Une région d'environ 4 kb a été clonée en amont du codon d'initiation. Des expériences préliminaires suggèrent que le promoteur du gène *CASP-2* est présent dans cette séquence. Ces travaux devraient permettre d'identifier les mécanismes de la régulation transcriptionnelle du gène *CASP-2* au cours du traitement par les agents anticancéreux. Il sera interessant par la suite d'identifier les mécanismes de la régulation transcriptionnelle des différents gènes *CASP* mais aussi de gènes codant pour des inhibiteurs comme le gène *c-FLIP*, situé à proximité de *CASP-8* et de *CASP-10* sur le chromosome 2q33-34. On peut espérer ainsi moduler l'expression des différents acteurs de l'apoptose dans les cellules tumorales afin de les sensibiliser à l'effet des agents cytotoxiques. Cette hypothèse sera la base du travail que nous effectuerons lors de notre stage d'étude post-doctoral.

A

Adrain C., Slee E.A., Harte M.T., Martin S.J. Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem.* 274:20855-20860, 1999.

Ahmad M., Srinivasula S.M., Wang L., Talanian R.V., Litwack G., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res.* 57:615-619, 1997.

Amarante-Mendes G.P., Finucane D.M., Martin S.J., Cotter T.G., Salvesen G.S., Green D.R. Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death. *Cell Death Differ.* 5:298-306, 1998.

Ambrosini G., Adida C., Altieri D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* 3:917-921, 1997.

Anglade P., Vyas S., Javoy-Agid F., Herrero M.T., Michel P.P., Marquez J., Mouatt-Prigent A., Ruberg M., Hirsch E.C., Agid Y. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol.* 12:25-31, 1997.

Antonsson B., Conti F., Ciavatta A., Montessuit S., Lewis S., Martinou I., Bernasconi L., Bernard A., Mermod J.J., Mazzei G., Maundrell K., Gambale .F, Sadoul R., Martinou J.C. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277:370-372, 1997.

Aragane Y., Kulms D., Metze D., Wilkes G., Poppelmann B., Luger T.A., Schwarz T. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol.* 140:171-182, 1998.

Ashkenazi A. & Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308, 1998.

B

Bakhshi A., Jensen J.P., Goldman P., Wright J.J., McBride O.W., Epstein A.L, Korsmeyer S.J. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41:899-906, 1985.

Basanez G., Nechushtan A., Drozhinin O., Chanturiya A., Choe E., Tutt S., Wood K.A., Hsu Y., Zimmerberg J., Youle R.J. Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5492-5497, 1999.

Beere H.M., Wolf B.B., Cain K., Mosser D.D., Mahboubi A., Kuwana T., Tailor P., Morimoto R.I., Cohen G.M., Green D.R. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.* 2:469-475, 2000.

Bergeron L., Perez G.I., Macdonald G., Shi L., Sun Y., Jurisicova A., Varmuza S., Latham K.E., Flaws J.A., Salter J.C., Hara H., Moskowitz M.A., Li E., Greenberg A., Tilly J.L., Yuan J. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev.* 12:1304-1314, 1998.

Bertin J., Armstrong R.C., Ottilie S., Martin D.A., Wang Y., Banks S., Wang G.H., Senkevich T.G., Alnemri E.S., Moss B., Lenardo M.J., Tomaselli K.J., Cohen J.I. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:1172-1176, 1997.

Bertin J., Nir W.J., Fischer C.M., Tayber O.V., Errada P.R., Grant J.R., Keilty J.J., Gosselin M.L., Robison K.E., Wong G.H., Glucksmann M.A., DiStefano P.S. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J Biol Chem.* 274:12955-12958, 1999.

Bird C.H., Sutton V.R., Sun J., Hirst C.E., Novak A., Kumar S., Trapani J.A., Bird P.I. Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Mol Cell Biol.* 18:6387-6398, 1998.

Bodmer J.L., Meier P., Tschopp J., Schneider P. Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem.* 275:20632-20637, 2000.

Boesen-de Cock J.G., Tepper A.D., de Vries E., van Blitterswijk W.J., Borst J. Common regulation of apoptosis signaling induced by CD95 and the DNA-damaging stimuli etoposide and gamma-radiation downstream from caspase-8 activation. *J Biol Chem.* 274:14255-14261, 1999.

Boldin M.P., Goncharov T.M., Goltsev Y.V., Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85:803-815, 1996.

Brockstedt E., Rickers A., Kostka S., Laubersheimer A., Dorken B., Wittmann-Liebold B., Bommert K., Otto A. Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3. *J Biol Chem.* 273:28057-28064, 1998.

Bruey J.M., Ducasse C., Bonniaud P., Ravagnan L., Susin S.A., Diaz-Latoud C., Gurbuxani S., Arrigo A.P., Kroemer G., Solary E., Garrido C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol,* 2:645-652, 2000.

Brunet C.L., Gunby R.H., Benson R.S., Hickman J.A., Watson A.J., Brady G. Commitment to cell death measured by loss of clonogenicity is separable from the appearance of apoptotic markers. *Cell Death Differ.* 5:107-115, 1998.

Buckley C.D., Pilling D., Henriquez N.V., Parsonage G., Threlfall K., Scheel-Toellner D., Simmons D.L., Akbar A.N., Lord J.M., Salmon M. RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature* 397:534-539, 1999.

Butt A.J., Harvey N.L., Parasivam G., Kumar S. Dimerization and autoprocessing of the Nedd2 (caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxyl-terminal regions. *J Biol Chem.* 273:6763-6768, 1998.

C

Cardone M.H., Roy N., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Franke T.F., Stanbridge E., Frisch S., Reed J.C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-1321, 1998.

Carson D.A. & Ribeiro J.M. Apoptosis and disease. *Lancet* 341:1251-1254, 1993.

Cataldo A.M., Barnett J.L., Berman S.A., Li J., Quarless S., Bursztajn S., Lippa C., Nixon R.A. Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron.* 14:671-680, 1995.

Cecconi F., Alvarez-Bolado G., Meyer B.I., Roth K.A., Gruss P. Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94:727-737, 1998.

Chan F.K., Chun H.J., Zheng L., Siegel R.M., Bui K.L., Lenardo M.J. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288:2351-2354, 2000.

Chandler J.M., Cohen G.M., MacFarlane M. Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J Biol Chem.* 273:10815-10818, 1998.

Chaudhary D., O'Rourke K., Chinnaiyan A.M., Dixit V.M. The death inhibitory molecules CED-9 and CED-4L use a common mechanism to inhibit the CED-3 death protease. *J Biol Chem.* 273:17708-17712, 1998.

Chen P., Rodriguez A., Erskine R., Thach T., Abrams J.M. Dredd, a novel effector of the apoptosis activators reaper, grim, and hid in Drosophila. *Dev Biol.* 201:202-216, 1998.

Cheng E.H., Kirsch D.G., Clem R.J., Ravi R., Kastan M.B., Bedi A., Ueno K., Hardwick J.M. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278:1966-1968, 1997.

Chinnaiyan A.M., Chaudhary D., O'Rourke K., Koonin E.V., Dixit V.M. Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature* 388:728-729, 1997.

Chittenden T., Flemington C., Houghton A.B., Ebb R.G., Gallo G.J., Elangovan C., Chinnadurai G., Lutz R.J. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.* 14:5589-5596, 1995.

Chou J.J., Matsuo H., Duan H., Wagner G. Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell* 94:171-180, 1998.

Cleary M.L., Smith S.D., Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47:19-28, 1986.

Clem R.J., Cheng E.H., Karp C.L., Kirsch D.G., Ueno K., Takahashi A., Kastan M.B., Griffin D.E., Earnshaw W.C., Veliuona M.A., Hardwick J.M. Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:554-559, 1998.

Colussi P.A., Harvey N.L., Kumar S. Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor. A novel function for a caspase prodomain. *J Biol Chem.* 273:24535-24542, 1998a.

Colussi P.A., Harvey N.L., Shearwin-Whyatt L.M., Kumar S. Conversion of procaspase-3 to an autoactivating caspase by fusion to the caspase-2 prodomain. *J Biol Chem.* 273:26566-26570, 1998b.

Cornillon S., Foa C., Davoust J., Buonavista N., Gross J.D., Golstein P. Programmed cell death in Dictyostelium. *J Cell Sci.* 107:2691-2704, 1994.

D

del Peso L., Gonzalez V.M., Nunez G. Caenorhabditis elegans EGL-1 disrupts the interaction of CED-9 with CED-4 and promotes CED-3 activation. *J Biol Chem.* 273:33495-33500, 1998.

De Maria R., Rippo M.R., Schuchman E.H., Testi R. Acidic sphingomyelinase (ASM) is necessary for fas-induced GD3 ganglioside accumulation and efficient apoptosis of lymphoid cells. *J Exp Med.* 187:897-902, 1998.

De Maria R., Zeuner A., Eramo A., Domenichelli C., Bonci D., Grignani F., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Testa U., Peschle C. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 401:489-493, 1999.

Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J.C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388:300-304, 1997.

Deveraux Q.L., Leo E., Stennicke H.R., Welsh K., Salvesen G.S., Reed J.C. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J.* 18:5242-5251, 1999.

Dimmeler S., Haendeler J., Nehls M., Zeiher A.M. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med.* 185:601-607, 1997.

Dorstyn L., Colussi P.A., Quinn L.M., Richardson H., Kumar S. DRONC, an ecdysone-inducible Drosophila caspase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4307-4312, 1999a.

Dorstyn L., Read S.H., Quinn L.M., Richardson H., Kumar S. DECAY, a novel Drosophila caspase related to mammalian caspase-3 and caspase-7. *J Biol Chem.* 274:30778-30783, 1999b.

Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42, 2000.

Duan H., Chinnaiyan A.M., Hudson P.L., Wing J.P., He W.W., Dixit V.M. 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. *J Biol Chem.* 271:1621-1625, 1996.

Duan H. & Dixit V.M. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* 385:86-89, 1997.

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.* 15:5504-5512, 1996.

Dubrez L., Eymin B., Sordet O., Droin N., Turhan A.G., Solary E. BCR-ABL delays apoptosis upstream of procaspase-3 activation. *Blood* 91:2415-2422, 1998.

Duckett C.S., Nava V.E., Gedrich R.W., Clem R.J., Van Dongen J.L., Gilfillan M.C., Shiels H., Hardwick J.M., Thompson C.B. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 15:2685-2694, 1996.

E

Ekert P.G., Silke J., Vaux D.L. Caspase inhibitors.*Cell Death Differ.* 6:1081-1086, 1999a.

Ekert P.G., Silke J., Vaux D.L. Inhibition of apoptosis and clonogenic survival of cells expressing crmA variants: optimal caspase substrates are not necessarily optimal inhibitors. *EMBO J.* 18:330-338, 1999b.

Ellis R.E., Yuan J.Y., Horvitz H.R. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol.* 7:663-698, 1991.

Enari M., Talanian R.V., Wong W.W., Nagata S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 380:723-726, 1996.

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.

Eskes R., Desagher S., Antonsson B., Martinou J.C. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol.* 20:929-935, 2000.

Esposti M.D. Apoptosis: Who was first? *Cell Death Differ.* 5:719, 1998.

Eymin B., Dubrez L., Allouche M., Solary E. Increased gadd153 messenger RNA level is associated with apoptosis in human leukemic cells treated with etoposide. *Cancer Res.* 57:686-695, 1997.

Eymin B., Haugg M., Droin N., Sordet O., Dimanche-Boitrel M.T., Solary E. p27Kip1 induces drug resistance by preventing apoptosis upstream of cytochrome c release andprocaspase-3 activation in leukemic cells. *Oncogene* 18:1411-1418, 1999a.

Eymin B., Sordet O., Droin N., Munsch B., Haugg M., Van de Craen M., Vandenabeele P., Solary E. Caspase-induced proteolysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 mediates its anti-apoptotic activity. *Oncogene* 18:4839-4847, 1999b.

F

Fadok V.A., Bratton D.L., Rose D.M., Pearson A., Ezekewitz R.A., Henson P.M. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405:85-90, 2000.

Fraser A.G., McCarthy N.J., Evan G.I. drICE is an essential caspase required for apoptotic activity in Drosophila cells. *EMBO J.* 16:6192-6199, 1997.

Frasch S.C., Henson P.M., Kailey J.M., Richter D.A., Janes M.S., Fadok V.A., Bratton D.L. Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase cdelta. *J Biol Chem.* 275:23065-23073, 2000.

Fujimura M., Kasahara K., Shirasaki H., Heki U., Iwasa K., Ueda A., Matsuda T. Up-regulation of ICH-1L protein by thromboxane A2 antagonists enhances cisplatin-induced apoptosis in non-small-cell lung-cancer cell lines. *Cancer Res Clin Oncol.* 125:389-394, 1999.

Fujita N., Nagahashi A., Nagashima K., Rokudai S., Tsuruo T. Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-XL protein by caspase-3-like proteases. *Oncogene* 17:1295-1304, 1998.

Fulda S., Strauss G., Meyer E., Debatin K.M. Functional CD95 ligand and CD95 death-inducing signaling complex in activation-induced cell death and doxorubicin-induced apoptosis in leukemic T cells. *Blood* 95:301-308, 2000.

G

Galea-Lauri J., Richardson A.J., Latchman D.S., Katz D.R. Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with TNF-alpha and cycloheximide: a possible role in immunopathology. *J Immunol.* 157:4109-4118, 1996.

Garcia-Calvo M., Peterson E.P., Leiting B., Ruel R., Nicholson D.W., Thornberry N.A. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem.* 273:32608-32613, 1998.

Garrido C., Bruey J.M., Fromentin A., Hammann A., Arrigo A.P., Solary E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J.* 13:2061-2070, 1999.

Ghayur T., Banerjee S., Hugunin M., Butler D., Herzog L., Carter A., Quintal L., Sekut L., Talanian R., Paskind M., Wong W., Kamen R., Tracey D., Allen H. Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* 386:619-623, 1997.

Goldstein J.C., Waterhouse N.J., Juin P., Evan G.I., Green D.R. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol.* 2:156-162, 2000.

Golstein P. Cell death: TRAIL and its receptors. *Curr Biol.* 7:R750-753, 1997.

Golstein P. Cell death in us and others. *Science* 281:1283, 1998.
Goltsev Y.V., Kovalenko A.V., Arnold E., Varfolomeev E.E., Brodianskii V.M., Wallach D. CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J Biol Chem.* 272:19641-19644, 1997.

Green D.R. & Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312, 1998.

Greenberg J.T. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12094-12097, 1996.

Gu Y., Wu J., Faucheu C., Lalanne J.L., Diu A., Livingston D.J., Su M.S. Interleukin-1 beta converting enzyme requires oligomerization for activity of processed forms in vivo. *EMBO J.* 14:1923-1931, 1995.

H

Hakem R., Hakem A., Duncan G.S., Henderson J.T., Woo M., Soengas M.S., Elia A., de la Pompa J.L., Kagi D., Khoo W., Potter J., Yoshida R., Kaufman S.A., Lowe S.W., Penninger J.M., Mak T.W. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94:339-352, 1998.

Han D.K.M., Chaudhary P.M., Wright M.E., Friedman C., Trask B.J., Riedel R.T., Baskin D.G., Schwartz S.M., Hood L. MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:11333-11338, 1997.

Harvey N.L., Butt A.J., Kumar S. Functional activation of Nedd2/ICH-1 (caspase-2) is an early process in apoptosis. *J Biol Chem.* 272:13134-13139, 1997.

Hausmann G., O'Reilly L.A., van Driel R., Beaumont J.G., Strasser A., Adams J.M., Huang D.C. Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L). *J Cell Biol.* 149:623-634, 2000.

Hengartner MO. Apoptosis. Death cycle and Swiss army knives. *Nature* 39:441-442, 1998.

Hu S., Vincenz C., Ni J., Gentz R., Dixit V.M. I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 272:17255-17257, 1997.

Hu Y., Ding L., Spencer D.M., Nunez G. WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem.* 273:33489-33494, 1998.

Hu Y., Benedict M.A., Ding L., Nunez G. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* 18:3586-3595, 1999.

I

Imai Y., Kimura T., Murakami A., Yajima N., Sakamaki K., Yonehara S. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* 398:777-785, 1999.

Inohara N., Koseki T., Hu Y., Chen S., Nunez G. CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:10717-10722, 1997a.

Inohara N., Ding L., Chen S., Nunez G. harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J.* 16:1686-1694, 1997b.

Inohara N., del Peso L., Koseki T., Chen S., Nunez G. RICK, a novel protein kinase containing a caspase recruitment domain, interacts with CLARP and regulates CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 273:12296-12300, 1998a.

Inohara N., Gourley T.S., Carrio R., Muniz M., Merino J., Garcia I., Koseki T., Hu Y., Chen S., Nunez G. Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *J Biol Chem.* 273:32479-32486, 1998b.

Inohara N., Koseki T., del Peso L., Hu Y., Yee C., Chen S., Carrio R., Merino J., Liu D., Ni J., Nunez G. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem.* 274:14560-14567, 1999.

Irmler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J.L., Schroter M., Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French L.E., Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-195, 1997.

Ito A., Uehara T., Nomura Y. Isolation of Ich-1S (caspase-2S)-binding protein that partially inhibits caspase activity. *FEBS Lett.* 470:360-364, 2000.

J

Jaattela M., Wissing D., Kokholm K., Kallunki T., Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.* 17:6124-6134, 1998.

Jürgensmeier J.M., Xie Z., Deveraux Q., Ellerby L., Bredesen D., Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:4997-5002, 1998.

K

Kasibhatla S., Brunner T., Genestier L., Echeverri F., Mahboubi A., Green D.R. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell* 1:543-551, 1998.

Kataoka T., Schroter M., Hahne M., Schneider P., Irmler M., Thome M., Froelich C.J., Tschopp J. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol.* 161:3936-3942, 1998.

Kelliher M.A., Grimm S., Ishida Y., Kuo F., Stanger B.Z., Leder P. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity* 8:297-303, 1998.

Kennedy N.J., Kataoka T., Tschopp J., Budd R.C. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med.* 190:1891-1896, 1999.

Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257, 1972.

Kharbanda S., Rubin E., Gunji H., Hinz H., Giovanella B., Pantazis P., Kufe D. Camptothecin and its derivatives induce expression of the c-jun protooncogene in human myeloid leukemia cells. *Cancer Res.* 5:6636-6642, 1991.

Kim C.H. & Gupta S. Expression of TRAIL (Apo2L), DR4 (TRAIL receptor 1), DR5 (TRAIL receptor 2) and TRID (TRAIL receptor 3) genes in multidrug resistant human acute myeloid leukemia cell lines that overexpress MDR 1 (HL60/Tax) or MRP (HL60/AR). *Int J Oncol.* 16:1137-1139, 2000.

King P., Goodbourn S. STAT1 is inactivated by a caspase. *J Biol Chem.* 273:8699-8704, 1998.

Kinoshita M., Tomimoto H., Kinoshita A., Kumar S., Noda M. Up-regulation of the Nedd2 gene encoding an ICE/Ced-3-like cysteine protease in the gerbil brain after transient global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 17:507-514, 1997.

Kitanaka C. & Kuchino Y. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ.* 6:508-515, 1999.

Komiyama T., Ray C.A., Pickup D.J., Howard A.D., Thornberry N.A., Peterson E.P., Salvesen G. Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *J Biol Chem.* 269:19331-19337, 1994.

Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol.* 60:619-642, 1998.

Kuida K., Lippke J.A., Ku G., Harding M.W., Livingston D.J., Su M.S., Flavell R.A. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267:2000-2003, 1995.

Kuida K., Zheng T.S., Na S., Kuan C., Yang D., Karasuyama H., Rakic P., Flavell R.A. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384:368-372, 1996.

Kuida K., Haydar T.F., Kuan C.Y., Gu Y., Taya C., Karasuyama H., Su M.S., Rakic P., Flavell R.A. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94:325-337, 1998.

Kumar S., Kinoshita M., Noda M., Copeland N.G., Jenkins N.A. 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 Dev.* 8:1613-1626, 1994a.

Kumar S., Kinoshita M., Noda M., Copeland N.G., Jenkins N.A. 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 Dev.* 8:1613-1626, 1994b.

Kumar S. ICE-like proteases in apoptosis.*Trends Biochem Sci.* 20:198-202, 1995a.

Kumar S., White D.L., Takai S., Turczynowicz S., Juttner C.A., Hughes T.P. Apoptosis regulatory gene NEDD2 maps to human chromosome segment 7q34-35, a region frequently affected in haematological neoplasms. *Hum Genet.* 95:641-644, 1995b.

Kumar S. Inhibition of apoptosis by the expression of antisense Nedd2. *FEBS Lett* . 368:69-72, 1995c.

Kumar S., Kinoshita M., Noda M. Characterization of a mammalian cell death gene Nedd2. *Leukemia* 3:385-386, 1997.

Kumar S. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Differ.* 6:1060-1066, 1999.

L

Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyers S., Poirier G.G., Earnshaw W.C. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371:346-347, 1994.

Leverkus M., Neumann M., Mengling T., Rauch C.T., Brocker E.B., Krammer P.H., Walczak H. Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes. *Cancer Res.* 60:553-559, 2000.

Li H., Bergeron L., Cryns V., Pasternack M.S., Zhu H., Shi L., Greenberg A., Yuan J. Activation of caspase-2 in apoptosis. *J Biol Chem.* 272:21010-21017, 1997.

Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501, 1998.

Li H., Kolluri S.K., Gu J., Dawson M.I., Cao X., Hobbs P.D., Lin B., Chen G., Lu J., Lin F., Xie Z., Fontana J.A., Reed J.C., Zhang X. Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* 289:1159-1164, 2000.

Li K., Li Y., Shelton J.M., Richardson J.A., Spencer E., Chen Z.J., Wang X., Williams R.S. Cell 101:389-399, 2000.

Li P., Allen H., Banerjee S., Franklin S., Herzog L., Johnston C., McDowell J., Paskind M., Rodman L., Salfeld J., *et al.* Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* 80:401-411, 1995.

Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489, 1997.

Liston P., Roy N., Tamai K., Lefebvre C., Baird S., Cherton-Horvat G., Farahani R., McLean M., Ikeda J.E., MacKenzie A., Korneluk R.G. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379:349-353, 1996.

Lithgow T., van Driel R., Bertram J.F., Strasser A. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ.* 5:411-417, 1994.

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

Los M., Van de Craen M., Penning L.C., Schenk H., Westendorp M., Baeuerle P.A., Droge W., Krammer P.H., Fiers W., Schulze-Osthoff K. Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature* 375:81-83, 1995.

Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490, 1998.

M

Mancini M., Machamer C.E., Roy S., Nicholson D.W., Thornberry N.A., Casciola-Rosen L.A., Rosen A. Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol.* 149:603-612, 2000.

Mannick J.B., Hausladen A., Liu L., Hess D.T., Zeng M., Miao Q.X., Kane L.S., Gow A.J., Stamler J.S. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 284:651-654, 1999.

Martinou J.C., Desagher S., Antonsson B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol.* 2:E41-43, 2000.

Martins L.M., Kottke T.J., Kaufmann S.H., Earnshaw W.C. Phosphorylated forms of activated caspases are present in cytosol from HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *Blood* 92:3042-3049, 1998.

Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Jurgensmeier J.M., Susin S.A., Vieira H.L., Prevost M.C., Xie Z., Matsuyama S., Reed J.C., Kroemer G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281:2027-2031, 1998.

McCarthy J.V., Ni J., Dixit V.M. RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem.* 273:16968-16975, 1998.

McCarthy N.J., Whyte M.K., Gilbert C.S., Evan G.I. Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol.* 136:215-227, 1997.

McCarthy J.V. & Cotter T.G. Cell shrinkage and apoptosis: a role for potassium and sodium ion efflux. *Cell Death Differ.* 4:756-770, 1997.

Medema J.P., Scaffidi C., Kischkel F.C., Shevchenko A., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 16:2794-2804, 1997.

Mesner P.W. Jr., Bible K.C., Martins L.M., Kottke T.J., Srinivasula S.M., Svingen P.A., Chilcote T.J., Basi G.S., Tung J.S., Krajewski S., Reed J.C., Alnemri E.S., Earnshaw W.C., Kaufmann S.H. Characterization of caspase processing and activation in HL-60 cell cytosol under cell-free conditions. Nucleotide requirement and inhibitor profile. *J Biol Chem.* 274:22635-22645, 1999.

Micheau O., Solary E., Hammann A., Martin F., Dimanche-Boitrel M.T. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst.* 89:783-789, 1997.

Micheau O., Solary E., Hammann A., Dimanche-Boitrel M.T. Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. *J Biol Chem.* 274:7987-7992, 1999a.

Micheau O., Hammann A., Solary E., Dimanche-Boitrel M.T. STAT-1-independent upregulation of FADD and procaspase-3 and -8 in cancer cells treated with cytotoxic drugs. *Biochem Biophys Res Commun.* 256:603-607, 1999b.

Miller T.M., Moulder K.L., Knudson C.M., Creedon D.J., Deshmukh M., Korsmeyer S.J., Johnson E.M. Jr. Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death. *J Cell Biol.* 139:205-217, 1997.

Miossec C., Dutilleul V., Fassy F., Diu-Hercend A. Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation. *J Biol Chem.* 272:13459-13462, 1997.

Mittl P.R., Di Marco S., Krebs J.F., Bai X., Karanewsky D.S., Priestle J.P., Tomaselli K.J., Grutter M.G. Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *J Biol Chem.* 272:6539-6547, 1997.

Muller M., Wilder S., Bannasch D., Israeli D., Lehlbach K., Li-Weber M., Friedman S.L., Galle P.R., Stremmel W., Oren M., Krammer P.H. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med.* 188:2033-2045, 1998.

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., Dixit V.M. 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, 1996.

N

Nagata S. & Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 16:39-43, 1995.

Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A., Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98-103, 2000.

Nakajima K., Takahashi A., Yaoita Y. Structure, expression, and function of the xenopus laevis caspase family. *J Biol Chem.* 275:10484-10491, 2000.

Nicholson D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 6:1028-1042, 1999.

O

O'Connor L., Strasser A., O'Reilly L.A., Hausmann G., Adams J.M., Cory S., Huang D.C. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* 17:384-395, 1998.

Okuno S., Shimizu S., Ito T., Nomura M., Hamada E., Tsujimoto Y., Matsuda H. Bcl-2 prevents caspase-independent cell death. *J Biol Chem.* 273:34272-34277, 1998.

Ossina N.K., Cannas A., Powers V.C., Fitzpatrick P.A., Knight J.D., Gilbert J.R., Shekhtman E.M., Tomei L.D., Umansky S.R., Kiefer M.C. Interferon-gamma modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression. *J Biol Chem.* 272:16351-16357, 1997.

P

Pan G., O'Rourke K., Dixit V.M. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem.* 273:5841-5845, 1998.

Perlman H., Pagliari L.J., Georganas C., Mano T., Walsh K., Pope R.M. FLICE-inhibitory protein expression during macrophage differentiation confers resistance to fas-mediated apoptosis. *J Exp Med.* 190:1679-1688, 1999.

Q

Qin H., Srinivasula S.M., Wu G., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S., Shi Y. Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature* 399:549-557, 1999.

R

Rao L., Perez D., White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol.* 135:1441-1455, 1996.

Rasper D.M., Vaillancourt J.P., Hadano S., Houtzager V.M., Seiden I., Keen S.L., Tawa P., Xanthoudakis S., Nasir J., Martindale D., Koop B.F., Peterson E.P., Thornberry N.A., Huang J., MacPherson D.P., Black S.C., Hornung F., Lenardo M.J., Hayden M.R., Roy S., Nicholson D.W. Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ.* 5: 271-288, 1998.

Reed J.C. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol.* 34:9-19, 1997.

Reed J.C. & Reed S.I. Survivin' cell-separation anxiety. *Nat Cell Biol.* 1:E199-E200, 1999.

Rothe M., Pan M.G., Henzel W.J., Ayres T.M., Goeddel D.V. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83:1243-1252, 1995.

Rotonda J., Nicholson D.W., Fazil K.M., Gallant M., Gareau Y., Labelle M., Peterson E.P., Rasper D.M., Ruel R., Vaillancourt J.P., Thornberry N.A., Becker J.W. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol.* 3:619-625, 1996.

Roy N., Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J.C. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 16:6914-6925, 1997.

Rubin E., Kharbanda S., Gunji H., Kufe D. Activation of the c-jun protooncogene in human myeloid leukemia cells treated with etoposide. *Mol Pharmacol.* 39:697-701, 1991.

Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12:697-715, 1996.

S

Sakahira H., Enari M., Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391:96-99, 1998.
Saleh A., Srinivasula S.M., Balkir L., Robbins P.D., Alnemri E.S. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol.* 2:476-483, 2000.

Samali A., Cai J., Zhivotovsky B., Jones D.P., Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J.* 18:2040-2048, 1999.

Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H., Peter M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17:1675-1687, 1998.

Scaffidi C., Schmitz I., Krammer P.H., Peter M.E. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 274:1541-1548, 1999.

Schlapbach R. & Fontana A. Differential activity of bcl-2 and ICE enzyme family protease inhibitors on Fas and puromycin-induced apoptosis of glioma cells. *Biochim Biophys Acta.* 1359:174-180, 1997.

Schlesinger P.H., Gross A., Yin X.M., Yamamoto K., Saito M., Waksman G., Korsmeyer S.J. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:11357-11362, 1997.

Schneider P., Thome M., Burns K., Bodmer J.L., Hofmann K., Kataoka T., Holler N., Tschopp J. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* 7:831-836, 1997.

Schweichel J.U. & Merker H.J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7:253-266, 1973.

Seol D.W. & Billiar T.R. A caspase-9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis. *J Biol Chem.* 274:2072-2076, 1999.

Sgonc R. & Wick G. Methods for the detection of apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 105:327-332, 1994.

Shaham S. & Horvitz H.R. An alternatively spliced C. elegans ced-4 RNA encodes a novel cell death inhibitor. *Cell* 86:201-208, 1996.

Shaham S. Identification of multiple Caenorhabditis elegans caspases and their potential roles in proteolytic cascades. *J Biol Chem.* 273:35109-35117, 1998.

Shearwin-Whyatt L.M., Harvey N.L., Kumar S. Subcellular localization and CARD-dependent oligomerization of the death adaptor RAIDD. *Cell Death Differ.* 7:155-165, 2000.

Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399:483-487, 1999.

Shimizu S., Tsujimoto Y. Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:577-582, 2000a.

Shimizu S., Konishi A., Kodama T., Tsujimoto Y. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:3100-3105, 2000b.

Shu H.B., Halpin D.R., Goeddel D.V. Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* 6:751-763, 1997.

Siegel R.M., Martin D.A., Zheng L., Ng S.Y., Bertin J., Cohen J., Lenardo M.J. Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J Cell Biol.* 141:1243-1253, 1998.

Siegel R.M., Frederiksen J.K., Zacharias D.A., Chan F.K., Johnson M., Lynch D., Tsien R.Y., Lenardo M.J. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288:2354-2357, 2000.

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. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 144:281-292, 1999.

Solary E., Droin N., Bettaieb A., Corcos L., Dimanche-Boitrel M-T., Garrido C. Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia* 14:1833-1849, 2000.

Song Q., Kuang Y., Dixit V.M., Vincenz C. Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J.* 18:167-178, 1999.

Song Z., McCall K., Steller H. DCP-1, a Drosophila cell death protease essential for development. *Science* 275:536-540, 1997.

Srinivasula S.M., Ahmad M., Ottilie S., Bullrich F., Banks S., Wang Y., Fernandes-Alnemri T., Croce C.M., Litwack G., Tomaselli K.J., Armstrong R.C., Alnemri ES. FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 272:18542-18545, 1997.

Srinivasula S.M., Ahmad M., Guo Y., Zhan Y., Lazebnik Y., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S. Identification of an endogenous dominant-negative short isoform of caspase-9 that can regulate apoptosis. *Cancer Res.* 59:999-1002, 1999.

Stennicke H.R., Deveraux Q.L., Humke E.W., Reed J.C., Dixit V.M., Salvesen G.S. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem.* 274:8359-8362, 1999.

Surh C.D. & Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372:100-103, 1994.

Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., Hirsch T., Marchetti P., Macho A., Daugas E., Geuskens M., Kroemer G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med.* 184:1331-1341, 1996.

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. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446, 1999a.

Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Brenner C., Larochette N., Prevost M.C., Alzari P.M., Kroemer G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med.* 189:381-394, 1999b.

Swanton E., Savory P., Cosulich S., Clarke P., Woodman P. Bcl-2 regulates a caspase-3/caspase-2 apoptotic cascade in cytosolic extracts. *Oncogene* 18:1781-1787, 1999.

T

Tamura T., Ueda S., Yoshida M., Matsuzaki M., Mohri H., Okubo T. Interferon-gamma induces Ice gene expression and enhances cellular susceptibility to apoptosis in the U937 leukemia cell line.*Biochem Biophys Res Commun.* 229:21-26, 1996.

Tang D., Lahti J.M., Grenet J., Kidd V.J. Cycloheximide-induced T-cell death is mediated by a Fas-associated death domain-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 274:7245-7252, 1999.

Tewari M., Quan L.T., O'Rourke K., Desnoyers S., Zeng Z., Beidler D.R., Poirier G.G., Salvesen G.S., 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* 81:801-809, 1995a.

Tewari M. & Dixit V.M. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem.* 270:3255-3260, 1995b.

Thome M., Schneider P., Hofmann K., Fickenscher H., Meinl E., Neipel F., Mattmann C., Burns K., Bodmer J.L., Schroter M., Scaffidi C., Krammer P.H., Peter M.E., Tschopp J. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386:517-521, 1997.

Thome M., Hofmann K., Burns K., Martinon F., Bodmer J.L., Mattmann C., Tschopp J. Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr Biol.* 8:885-888, 1998.

Thornberry N.A., Bull H.G., Calaycay J.R., Chapman K.T., Howard A.D., Kostura M.J., Miller D.K., Molineaux S.M., Weidner J.R., Aunins J., *et al.* A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356:768-774, 1992.

Thornberry N.A. & Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316, 1998.

Trauth B.C., Klas C., Peters A.M., Matzku S., Moller P., Falk W., Debatin K.M., Krammer P.H. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245:301-305, 1989.

Tsujimoto Y., Gorham J., Cossman J., Jaffe E., Croce C.M. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 229:1390-1393, 1985.

Tsujimoto Y. & Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett.* 466:6-10, 2000.

U

Uren A.G., Pakusch M., Hawkins C.J., Puls K.L., Vaux D.L. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:4974-4978, 1996.

V

Van de Craen M., Vandenabeele P., Declercq W., Van den Brande I., Van Loo G., Molemans F., Schotte P., Van Criekinge W., Beyaert R., Fiers W. Characterization of seven murine caspase family members. *FEBS Lett.* 403:61-69, 1997.

Van de Craen M., Declercq W., Van den brande I., Fiers W., Vandenabeele P. The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ.* 6:1117-1124, 1999.

Vander Heiden M.G., Chandel N.S., Williamson E.K., Schumacker P.T., Thompson C.B. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91:627-637, 1997.

Vander Heiden M.G. & Thompson C.B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol.* 1:E209-E216, 1999.

Varfolomeev E.E., Schuchmann M., Luria V., Chiannilkulchai 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. 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, 1998.

Vayssière J.L., Petit P.X., Risler Y., Mignotte B. Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:11752-11756, 1994.

Verhagen A., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J., Vaux D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102:43-53, 2000.

Verhoven B., Krahling S., Schlegel R.A., Williamson P. Regulation of phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic T lymphocytes. *Cell Death Differ.* 6:262-270, 1999.

Vucic D., Kaiser W.J., Miller L.K. Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by Drosophila proteins HID and GRIM. *Mol Cell Biol.* 18:3300-3309, 1998.

W

Walker N.P., Talanian R.V., Brady K.D., Dang L.C., Bump N.J., Ferenz C.R., Franklin S., Ghayur T., Hackett M.C., Hammill L.D., *et al.* Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)2 homodimer. *Cell* 78:343-352, 1994.

Wang J., Lobito A.A., Shen F., Hornung F., Winoto A., Lenardo M.J. Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP. *Eur J Immunol.* 30:155-163, 2000.

Wang L., Miura M., Bergeron L., Zhu H., Yuan J. Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 78:739-750, 1994.

Wang S., Miura M., Jung Y.K., Zhu H., Gagliardini V., Shi L., Greenberg A.H., Yuan J. Identification and characterization of Ich-3, a member of the interleukin-1beta converting enzyme (ICE)/Ced-3 family and an upstream regulator of ICE. *J Biol Chem.* 271:20580-20587, 1996.

Wang S., Miura M., Jung Y.K., Zhu H., Li E., Yuan J. Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* 92:501-509, 1998.

Wang Y., Wu T.R., Cai S., Welte T., Chin Y.E. Stat1 as a component of tumor necrosis factor alpha receptor 1-TRADD signaling complex to inhibit NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol.* 20:4505-4512, 2000.

Waterman M.J., Stavridi E.S., Waterman J.L., Halazonetis T.D. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet.* 19:175-178, 1998.

Wilson K.P., Black J.A., Thomson J.A., Kim E.E., Griffith J.P., Navia M.A., Murcko M.A., Chambers S.P., Aldape R.A., Raybuck S.A., *et al.* Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370:270-275, 1994.

Woo R.A., McLure K.G., Lees-Miller S.P., Rancourt D.E., Lee P.W. DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature* 394:700-704, 1998.

Wyllie A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-556, 1980.

X

Xanthoudakis S., Roy S., Rasper D., Hennessey T., Aubin Y., Cassady R., Tawa P., Ruel R., Rosen A., Nicholson D.W. Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J.* 18:2049-2056, 1999.

Xiang J., Chao D.T., Korsmeyer S.J. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:14559-14563, 1996.

Y

Yaoita Y. & Nakajima K. Induction of apoptosis and CPP32 expression by thyroid hormone in a myoblastic cell line derived from tadpole tail. *J Biol Chem.* 272:5122-5127, 1997.

Yonehara S., Ishii A., Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 169:1747-1756, 1989.

Z

Zanke B.W., Lee C., Arab S., Tannock I.F. Death of tumor cells after intracellular acidification is dependent on stress-activated protein kinases (SAPK/JNK) pathway activation and cannot be inhibited by Bcl-2 expression or interleukin1beta-converting enzyme inhibition. *Cancer Res.* 58:2801-2808, 1998.

Zha J., Harada H., Osipov K., Jockel J., Waksman G., Korsmeyer S.J. BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem.* 272:24101-24104, 1997.

Zhang Y., Center D.M., Wu D.M., Cruikshank W.W., Yuan J., Andrews D.W., Kornfeld H. Processing and activation of pro-interleukin-16 by caspase-3. *J Biol Chem.* 273:1144-1149, 1998.

Zhang J., Reedy M.C., Hannun Y.A., Obeid L.M. Inhibition of caspases inhibits the release of apoptotic bodies: Bcl-2 inhibits the initiation of formation of apoptotic bodies in chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 145:99-108, 1999.

Zheng T.S., Hunot S., Kuida K., Flavell R.A. Caspase knockouts: matters of life and death. *Cell Death Differ.* 6:1043-1053, 1999.

Zhou L., Song Z., Tittel J., Steller H. HAC-1, a Drosophila homolog of APAF-1 and CED-4 functions in developmental and radiation-induced apoptosis. *Mol Cell.* 4:745-755, 1999.

Zhou Q., Snipas S., Orth K., Muzio M., Dixit V.M., Salvesen G.S. Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem.* 272:7797-800, 1997.

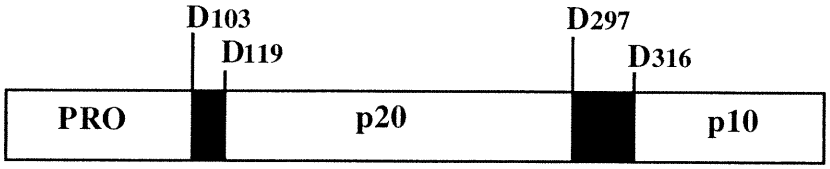
Zhou Q., Krebs J.F., Snipas S.J., Price A., Alnemri E.S., Tomaselli K.J., Salvesen G.S. Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry* 37:10757-10765, 1998.

Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A., Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90:405-413, 1997.

Zou H., Li Y., Liu X., Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* 274:11549-11556, 1999.

ANNEXE I

CASPASE-1



Autres noms: ICE

Type de caspase: long prodomaine contenant un motif CARD (Classe I)

Gène:
localisation: chromosome 11 en q22.2-22.3
taille (ARNm): 1.5 kb
isoformes connues: 5 isoformes (α, β, γ, δ et ε)
localisation tissulaire: monocytes, lymphocytes, neutrophiles du sang périphérique, placenta, lymphocytes activés.

Protéine:
taille: 45 kDa (isoformes variant de 30-45 kDa)
localisation cellulaire: cytosol, noyau
site de clivage préférentiel: YEVD / X, WEHD / X
domaine de régulation: prodomaine amplifiant l'activation de la procaspase-8 et permettant une localisation nucléaire
modification post-traductionnelle: aucune connue

Phénotype Knock out:

effet sur le développement:

Développement de la souris normal sans un phénotype particulier

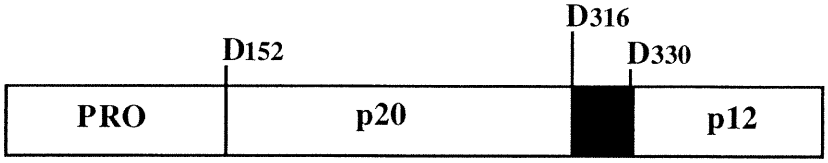
effet sur l'apoptose:

Atténuation de la réponse à FasL dans les thymocytes
Résistance des neurones à l'apoptose induite par privation de certains facteurs de croissance

Implication:
inflammation/maturation des cytokines (IL-1 β et IL-18)
apoptose
pathologies: Huntington, Alzheimer

ANNEXE I

CASPASE-2



Autres noms: NEDD-2 / ICH-1

Type de caspase: long prodomaine contenant un motif CARD (Classe I)

Gène:
localisation: chromosome 7 en q34-35
taille (ARNm): 4.0 kb
isoformes connues: 2 isoformes (L et S)
localisation tissulaire: placenta, poumons, rate, pancréas

Protéine:
taille: procaspase-2L: 48 kDa procaspase-2S: 33 kDa
localisation cellulaire: cytosol, mitochondries, noyau, RE, Golgi
site de clivage préférentiel: VDVAD / X, DEHD / X
domaine de régulation: prodomaine permettant une localisation nucléaire
modification post-traductionnelle: phosphorylation

Phénotype Knock out:

effet sur le développement:

Développement de la souris normal sans un phénotype particulier

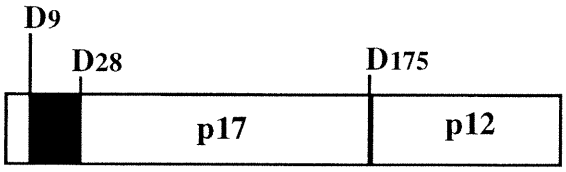
effet sur l'apoptose:

1) les lymphocytes B des souris casp2$^{-/-}$ sont résistants à l'apoptose induite par le granzyme B mais pas à celle induite par les récepteurs Fas et TNF
2) les oocytes des souris casp2$^{-/-}$ sont résistants à l'apoptose induite par la doxorubicine
3) la mort cellulaire programmée des motoneurones faciaux est accélérée dans les souris casp2$^{-/-}$

Implication: apoptose
pathologies: leucémie aiguë lymphoblastique, leucémie aiguë myéloblastique, Alzheimer

ANNEXE I

CASPASE-3



Autres noms: CPP32 / apopain / Yama

Type de caspase: court prodomaine (Classe II)

Gène:
localisation: chromosome 4 en q33-35.1
taille (ARNm): 2.3 kb
isoformes connues: 2 isoformes (α et β)
localisation tissulaire: système immunitaire (lymphocytes, prémyélocytes)

Protéine:
taille: 32 kDa
localisation cellulaire: cytosol, mitochondries
site de clivage préférentiel: DMQD / X, DEVD / X
domaine de régulation: aucun connu
modification post-traductionnelle: nitrosylation

Phénotype Knock out:

effet sur le développement:

Létalité périnatale
Malformation au niveau du cerveau

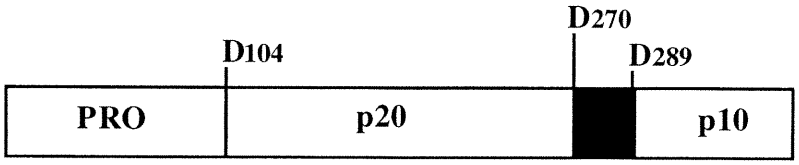
effet sur l'apoptose:

1) dans les cellules casp3$^{-/-}$, pas de fragmentation de l'ADN
2) diminution de la mort cellulaire des neurones pendant le développement des souris casp3$^{-/-}$

Implication: apoptose: rôle central
pathologies: Parkinson, Alzheimer, Farber

ANNEXE I

CASPASE-4



Autres noms: ICErel-II / TX / Ich2

Type de caspase: long prodomaine contenant un motif CARD (Classe I)

Gène:
localisation: chromosome 11 en q22.2-22.3
taille (ARNm): 1.5 kb
isoformes connues: aucune
localisation tissulaire: rate, thymus, ovaires, intestin, PBL, placenta, poumons, foie, pancréas

Protéine:
taille: 43 kDa
localisation cellulaire: cytosol
site de clivage préférentiel: LEVD / X, (W/L)EHD / X
domaine de régulation: aucun connu
modification post-traductionnelle: aucune connue

Phénotype Knock out: pas publié

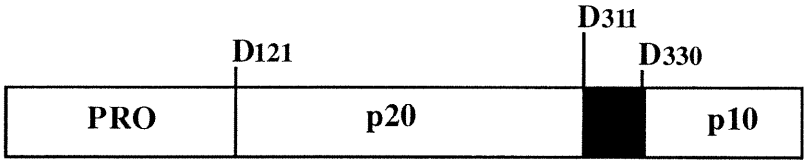
effet sur le développement:

effet sur l'apoptose:

Implication:
inflammation/maturation des cytokines
apoptose

ANNEXE I

CASPASE-5



Autres noms: ICErel-III / TY

Type de caspase: long prodomaine contenant un motif CARD (Classe I)

Gène:
localisation: chromosome 11 en q22.2-22.3
taille (ARNm): 1.4 kb
isoformes connues: aucune
localisation tissulaire: rate, thymus, ovaires, intestin, PBL, placenta, poumons, foie, pancréas

Protéine:
taille: 43 kDa
localisation cellulaire: cytosol
site de clivage préférentiel: (W/L)EHD / X
domaine de régulation: aucun connu
modification post-traductionnelle: aucune connue

Phénotype Knock out: pas publié

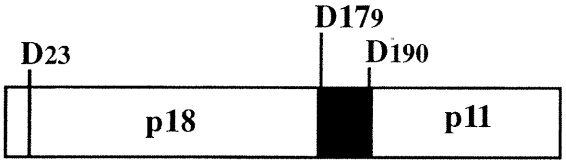
effet sur le développement:

effet sur l'apoptose:

Implication:
inflammation/maturation des cytokines
apoptose

ANNEXE I

CASPASE-6



Autres noms: Mch-2

Type de caspase: court prodomaine (Classe II)

Gène:
localisation: chromosome 4 en q25-26
taille (ARNm): 2.4 kb
isoformes connues: 2 isoformes (α et β)
localisation tissulaire: coeur, poumons, muscle squelettique, pancréas, rate, thymus, prostate, testicules, ovaires, intestin, colon, PBL

Protéine:
taille: 34 kDa
localisation cellulaire: cytosol
site de clivage préférentiel: VEID / X, VEHD / X
domaine de régulation: aucun connu
modification post-traductionnelle: aucune connue

Phénotype Knock out:

effet sur le développement:

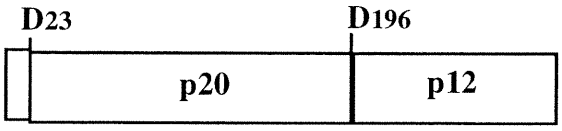
Développement de la souris normal sans un phénotype particulier

effet sur l'apoptose:

Implication:
apoptose
pathologies: Alzheimer

ANNEXE I

CASPASE-7



Autres noms: Mch-3 / ICE-LAP3 / CMH-1

Type de caspase: court prodomaine (Classe II)

Gène:
localisation: chromosome 10 en q25.1-25.2
taille (ARNm): 2.4 kb
isoformes connues: 2 isoformes (α et β)
localisation tissulaire: reins, thymus, ovaires, intestin

Protéine:
taille: 35 kDa
localisation cellulaire: cytosol, mitochondrie
site de clivage préférentiel: DEVD / X
domaine de régulation: aucun connu
modification post-traductionnelle: aucune connue

Phénotype Knock out:

effet sur le développement:

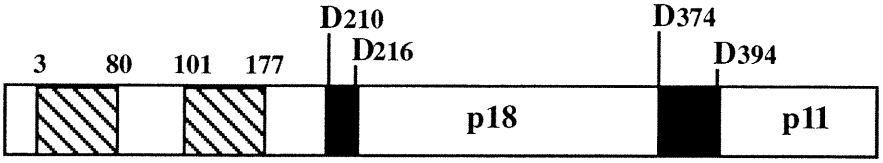
Souris casp7$^{-/-}$ mourant très tôt pendant le développement embryonnaire

effet sur l'apoptose:

Implication: apoptose

ANNEXE I

CASPASE-8



Autres noms: MACH / FLICE / Mch5

Type de caspase: long prodomaine contenant deux motifs DED (Classe I)

Gène:
localisation: chromosome 2 en q33-34
taille (ARNm): 4 kb
isoformes connues: 7 isoformes (α 1,2,3 et β 1,2,3,4)
localisation tissulaire: PBL, côlon, intestin, thymus, rate, reins, foie, poumons, coeur, placenta, pancréas

Protéine:
taille: 55 kDa
localisation cellulaire: cytosol, mitochondrie
site de clivage préférentiel: IETD / X, LETD / X
domaine de régulation: prodomaines formant des filaments
modification post-traductionnelle: aucune connue

Phénotype Knock out:

effet sur le développement:

Souris casp8$^{-/-}$ mourant aux jours E9-E11.5
Malformation au niveau du coeur et présence d'hémorragies abdominales

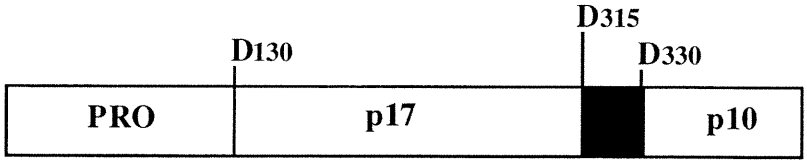
effet sur l'apoptose:

les cellules MEFs casp8$^{-/-}$ sont résistantes à l'apoptose induite par les récepteurs Fas, TNF et DR3 mais toujours sensibles à l'apoptose induite par la dexaméthasone, l'étoposide, les UV, la staurosporine, le céramide C6 et la privation de serum

Implication:
apoptose
pathologie: gène *CASP8* inactivé dans les neuroblastomes

ANNEXE I

CASPASE-9



Autres noms: ICE-LAP6 / Mch6

Type de caspase: long prodomaine contenant un motif CARD (Classe I)

Gène:
localisation: chromosome 1 en p36-36.3
taille (ARNm): 2.3 kb
isoformes connues: 2 isoformes (a et b)
localisation tissulaire:

Protéine:
taille: procaspase-9: 46 kDa caspase-9b: 30 kDa
localisation cellulaire: cytosol, mitochondrie
site de clivage préférentiel: LEHD / X
domaine de régulation: caspase-9b compétitionnant avec la procaspase-9 pour interagir avec APAF1
modification post-traductionnelle: phosphorylation

Phénotype Knock out:

effet sur le développement:

Létalité périnatale
Malformation au niveau du cerveau

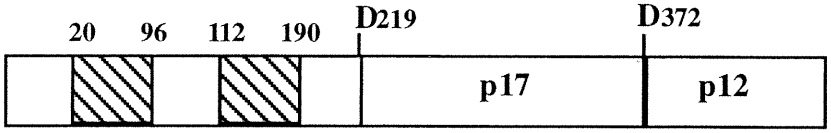
effet sur l'apoptose:

1) diminution de la mort cellulair programmée des neurones pendant le développement
2) les thymocytes casp9$^{-/-}$ sont résistants à l'apoptose induite par la dexaméthasone, l'étoposideet les radiations mais sont toujours sensibles à l'apoptose induite par les UV, les chocs osmotiques et de chaleur, les récepteurs Fas et TNF

Implication: apoptose

ANNEXE I

CASPASE-10



Autres noms: Mch4 / FLICE2

Type de caspase: long prodomaine contenant deux motifs DED (Classe I)

Gène:
localisation: chromosome 2 en q33-34
taille (ARNm): 4 kb
isoformes connues: 4 isoformes (a, b, c et d)
localisation tissulaire: coeur, placenta, poumons, foie, muscle squelettique, pancréas, rate, thymus, intestin

Protéine:
taille: 55 kDa
localisation cellulaire: cytosol
site de clivage préférentiel: IEAD / X
domaine de régulation: aucun connu
modification post-traductionnelle: aucune connue

Phénotype Knock out: pas publié

effet sur le développement:

effet sur l'apoptose:

Implication:
apoptose
pathologie

ANNEXE I

CASPASE-11 (murine)

Autres noms: Ich3

Type de caspase: long prodomaine contenant un motif CARD (Classe I)

Gène:
localisation: pas spécifié
taille (ARNm): 1.4 kb
isoformes connues: inconnu
localisation tissulaire: coeur, poumons, thymus, rate, reins

Protéine:
taille: 43 kDa et 38 kDa
localisation cellulaire: pas spécifié
site de clivage préférentiel: pas spécifié
domaine de régulation: aucun connu
modification post-traductionnelle: aucune connue

Phénotype Knock out:

effet sur le développement:

Développement de la souris normal sans un phénotype particulier
Souris résistantes aux chocs septiques

effet sur l'apoptose:

1) l'apoptose dépendant de ICE est bloquée
2) les sous-unités des caspases-1 et -11 peuvent s'hétérodimériser

Implication: inflammation/maturation des cytokines (IL-1α et IL-1β)
apoptose

ANNEXE I

CASPASE-12 (murine)

Autres noms: aucun

Type de caspase: long prodomaine contenant un motif CARD (Classe I)

Gène:
localisation: pas spécifié
taille (ARNm): pas spécifié
isoformes connues: aucunes
localisation tissulaire: muscle, foie, reins

Protéine:
taille: 60 kDa
localisation cellulaire: RE
site de clivage préférentiel: pas spécifié
domaine de régulation: aucun connu
modification post-traductionnelle: aucune connue

Phénotype Knock out:

effet sur le développement:

Développement de la souris normal sans un phénotype particulier

effet sur l'apoptose:

1) sensibilité à l'apoptose non changée
2) résistantes au stress

Implication:
apoptose
pathologies: Alzheimer

ANNEXE I

CASPASE-13 (humaine)

Autres noms: ERICE

Type de caspase: long prodomaine contenant un motif CARD (Classe I)

Gène:
localisation: pas spécifié
taille (ARNm): 1.6 kb
isoformes connues: aucune
localisation tissulaire: PBL, poumons, rate, placenta

Protéine:
taille: 43 kDa
localisation cellulaire: pas spécifié
site de clivage préférentiel: pas spécifié
domaine de régulation: aucun connu
modification post-traductionnelle: aucune connue

Phénotype Knock out: pas publié

effet sur le développement:

effet sur l'apoptose:

Implication: apoptose

ANNEXE I

CASPASE-14 (murine)
homologue humain identifié

Autres noms: MICE

Type de caspase: court prodomaine (Classe II)

Gène:
localisation: *hCasp14* sur le chromosome 19 en p13.1
taille (ARNm): 2.5 kb
isoformes connues: aucunes
localisation tissulaire: exprimée au cours du développement embryonnaire de la souris / exprimée que dans la peau chez l'adulte

Protéine:
taille: 33 kDa
localisation cellulaire: inconnu
site de clivage préférentiel: inconnu
domaine de régulation: inconnu
modification post-traductionnelle: inconnu

Phénotype Knock out: pas publié

effet sur le développement:

effet sur l'apoptose:

Implication: au cours du développement (à vérifier en générant des souris déficientes en caspase-14)
1) la caspase-14 murine est un substrat de la caspase-8 mais pas des caspases-1, -2, -3, -6, -7 et -11
2) la caspase-14 murine ne peut pas s'autoactiver chez la levure
3) sa surexpression n'induit pas d'apoptose

ANNEXE II

LISTE DE PUBLICATIONS

Travail personnel :

1. DROIN N, DUBREZ L, EYMIN B, RENVOIZE C, BREARD J, SOLARY E. Upregulation of CASP genes in human tumor cells undergoing etoposide-induced apoptosis. **Oncogene**, 1998; 5:480-487.

2. DROIN N, BICHAT F, REBE C, WOTAWA A, SORDET O, HAMMANN A, BERTRAND R, SOLARY E. Involvement of caspase-2 long isoform in Fas-mediated cell death of human leukemic cells. Version révisée de l'article soumise à publication dans Blood.

3. DROIN N, REBE C, BICHAT F, HAMMANN A, BERTRAND R, SOLARY E. Modulation of apoptosis by procaspase-2 short isoform: selective inhibition of chromatin condensation, apoptotic body formation and phosphatidylserine externalization. Article accepté pour publication dans Oncogene.

4. DROIN N, BEAUCHEMIN M, SOLARY E, BERTRAND R. Identification of a caspase-2 isoform that behaves as an endogenous inhibitor of the caspase cascade. Article accepté pour publication dans Cancer Research.

Revue générale :

1. SOLARY E, EYMIN B, DROIN N, HAUGG M. Proteases, Proteolysis and Apoptosis. **Cell Biology and Toxicology**, 1998; 14:121-132.

2. SOLARY E, DROIN N, BETTAIEB A, CORCOS L, DIMANCHE-BOITREL M-T, GARRIDO C. Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. **Leukemia**, sous presse.

3. SOLARY E, DROIN N, SORDET O, REBE C, FILOMENKO R, WOTAWA A, PLENCHETTE S, DUCOROY P. Cell deayh pathways as targets for anticancer drugs. **Anticancer Drug Design** edited by Bruce G. Baguley, Elsewhere ed. sous presse.

Collaborations :

1. DUBREZ L, EYMIN B, SORDET O, DROIN N, THURAN A, SOLARY E. BCR-ABL delays etoposide-induced apoptosis upstream of procaspase-3 activation. **Blood,** 1998; 7:2415-2422.
2. BONNOTTE B, FAVRE N, REVENEAU S, MICHEAU O, DROIN N, GARRIDO C, FONTANA A, CHAUFFERT B, SOLARY E, MARTIN F. Cancer cell sensitization to fas-mediated apoptosis by sodium butyrate. **Cell Death and Differentiation**, 1998, 5:480-487.
3. EYMIN B, HAUGG M, DROIN N, SORDET O, DIMANCHE-BOITREL MT, SOLARY E. p27 ^{Kip1} induces drug resistance by preventing apoptosis upstream of cytochrome c release from mitochondria and procaspase-3 activation. **Oncogene**, 1999, 18, 1411-1418.

4. SORDET O, BETTAIEB A, BRUEY JM, EYMIN B, DROIN N, IVARSSON M, GARRIDO C, SOLARY E. Selective inhibition of apoptosis by TPA-induced differentiation of U937 leukemic cells. **Cell Death & Differentiation**, 1999, 6: 351-361.
5. FAVRE N, BONNOTTE B, DROIN N, FROMENTIN A, SOLARY E, MARTIN F. Fas ligand expression by tumor cell variants can be unrelated to their capacity to induce tolerance or immune rejection. **Int J Cancer**, 1999, 82: 359-367.
6. EYMIN B, SORDET O, DROIN N, MUNSCH B, HAUGG M, VAN DE CRAEN M, VANDENABEELE P, SOLARY E. Caspase-induced proteolysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor 27^{Kip1} mediates its anti-apoptotic activity. **Oncogene**, 1999, 18: 4839-4847.

Communications :

1. DROIN N, DUBREZ L, EYMIN B, BREARD J, HAUGG M, MUNSCH B, SOLARY E. Modulation of ICE-like protease gene expression in bcl-2- and bcr-abl-positive and negative human leukemic cell lines treated with VP16. American Association For Cancer Research, San Diego, 1997.
2. DROIN N, DUBREZ L, EYMIN B, HAUGG M, SORDET O, MUNSCH B, RENVOIZE C, BREARD J, SOLARY E. Caspases impliquées dans l'apoptose: expression et modulation des gènes CASP dans les cellules leucémiques humaines traitées par l'étoposide. Forum des jeunes chercheurs, Besançon, 1997.
3. DROIN N, DUBREZ L, EYMIN B, HAUGG M, SORDET O, MUNSCH B, RENVOIZE C, BREARD J, SOLARY E. Caspases impliquées dans l'apoptose: expression et modulation des gènes CASP dans les cellules leucémiques humaines traitées par l'étoposide. Journée Scientifique des UFR Médecine et Pharmacie, Dijon, 1997.
4. DROIN N, DUBREZ L, EYMIN B, HAUGG M, SORDET O, MUNSCH B, RENVOIZE C, BREARD J, SOLARY, E. Caspases impliquées dans l'apoptose: expression et modulation des gènes CASP dans les cellules leucémiques humaines traitées par l'étoposide. 4ème Congrès annuel du CHO, Arcachon, 1997.
5. EYMIN B, MUNSCH B, DUBREZ L, HAUGG M, SORDET O, DROIN N, BREARD J, SOLARY E. Clivage de la p27 ^{Kip1} durant l'apoptose induite par l'étoposide et par Fas dans les cellules leucémiques humaines. 4ème Congrès annuel du CHO, Arcachon, 1997.
6. SORDET O, EYMIN B, DROIN N, SOLARY E. L'inhibition de l'apoptose des cellules leucémiques U937 différenciées sous l'effet du TPA est spécifique de la voie d'induction. Société Française d'Hématologie, Paris, 1-3 Février 1998. Communication orale
7. EYMIN B, MUNSCH B, HAUGG M, SORDET O, DROIN N, BRÈARD J, SOLARY E. p27 ^{Kip1}, a drug resistance factor that is cleaved in human leukemic cell lines undergoing apoptosis. American Association For Cancer Research, New Orleans, March 28-April 1, 1998
8. SOLARY E, EYMIN B, MUNSH B, DROIN N, DUBREZ L, HAUGG M, MICHEAU O, SORDET O. Les protéases dans l'apoptose induite par l'étoposide et l'activation de Fas. Institut Paris-sud sur les cytokines Journée Thématique " apoptose", Mai 1998

9. SORDET O, EYMIN B, DROIN N, SOLARY E. La différenciation des cellules leucémiques inhibe l'apoptose induite par l'étoposide en amont de l'activation des caspases. XVIIIème forum de cancérologie, Paris, 2-3 Juin 1998. Présentation de poster

10. DROIN N, DUBREZ L, EYMIN B, HAUGG M, SORDET O, RENVOIZE C, BREARD J, SOLARY E. Expression et modulation des gènes CASP dans l'apoptose induite par l'étoposide dans les cellules tumorales humaines. XVIIIème forum de cancérologie, Paris, 2-3 Juin 1998. Communication orale

11. SORDET O, EYMIN B, DROIN N, SOLARY E. La différenciation des cellules leucémiques inhibe l'apoptose induite par l'étoposide en amont de l'activation des caspases. Colloque des sciences de la vie et de la santé, Forum des jeunes chercheurs, Dijon, 18-19 Juin 1998. Communication orale

12. DROIN N, EYMIN B, SORDET O, SOLARY E. Implication des isoformes courte et longue de la procaspase-2 dans l'apoptose induite par l'étoposide et par Fas, respectivement. Colloque des sciences de la vie et de la santé, Forum des jeunes chercheurs, Dijon, 18-19 Juin 1998

13. EYMIN B, MUNSCH B, DROIN N, SORDET O, SOLARY E. La surexpression de la protéines p27^{Kip1}, un inhibiteur des cyclines-CDK, induit la résistance des cellules leucémiques humaines aux agents cytotoxiques. Colloque des sciences de la vie et de la santé, Forum des jeunes chercheurs, Dijon, 18-19 Juin 1998

14. SORDET O, BETTAIEB A, BRUEY JM, EYMIN B, DROIN N, IVARSSON M, GARRIDO C , SOLARY E. Selective inhibition of apoptosis in TPA-differentiated U937 leukemic cells. The sixth euroconference on apoptosis. Saltsjo-boo, Sweden, 24-27 September 1998. Présentation de poster

15. DROIN, N, SOLARY, E, BERTRAND, R. Implication des isoformes courte et longue de la procaspase-2 dans l'apoptose induite par l'étoposide et Fas, respectivement. 9ième Journée Scientifique, Institut du Cancer de Montréal, Montréal, 28 Novembre 1998. Communication orale

16. SORDET O, EYMIN B, DROIN N, BETTAIEB A, BELON JP, SOLARY E. La différenciation des cellules leucémiques inhibe l'apoptose induite par l'étoposide en amont de l'activation des caspases. 2ème journée de rencontre de l'association des enseignants de pharmacologie des Facultés de Pharmacie, Grenoble, 8 Décembre 1998. Présentation de poster

17. EYMIN B, HAUGG M, DROIN N, SORDET O, DIMANCHE-BOITREL MT, SOLARY E. p27 ^{Kip1} est un facteur de résistance à l'apoptose induite par les agonistes de fas et les agents cytotoxiques dans les cellules. Société Française d'Hématologie, Paris, 14-16 Mars 1999

18. SORDET O, BETTAIEB A, BRUEY JM, EYMIN B, DROIN N, IVARSSON M, GARRIDO C, BELON JP, SOLARY E. Selective inhibition of apoptosis in TPA-differentiated U937 human leukemic cells. Société Française de Pharmacologie, Nantes, 15-17 Mars 1999. Présentation de poster

19. DROIN N, BICHAT F, REBE C, EYMIN B, SORDET O, BELON JP, SOLARY E. Involvement of caspase-2 long isoform in Fas-induced apoptosis of leukemic cells. American Association For Cancer Research, Philadelphia, April 10-14, 1999.

20. BREY J, DROIN N, HAUGG M, WOTAWA A, SORDET O, SOLARY E. Rôle de la caspase-3 dans l'apoptose des cellules leucémiques humaines induite par divers stimuli. XIXème forum de cancérologie, Paris, 30 mai -1er Juin 1999. Communication orale

21. DROIN N, BICHAT F, REBE C, EYMIN B, SORDET O, BELON JP, SOLARY E. Antiapoptotic effect of procaspase-2S in etoposide-treated U937 cells via its catalytic site. American Association For Cancer Research, Philadelphia, April 10-14, 1999.
22. DROIN N, BEAUCHEMIN M, SOLARY E, BERTRAND R. Identification de nouvelles isoformes de la procaspase-2: rôle dans l'apoptose. Congrès annuel des stagiaires de recherche de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal, Montréal, 19 Janvier 2000. Communication orale

Les caspases sont des enzymes très conservées au cours de l'évolution dont certaines jouent un rôle effecteur au cours de la mort cellulaire par apoptose. Dans des cellules tumorales humaines exposées à un agent cytotoxique, nous avons observé une augmentation de la transcription de certains gènes codant pour ces enzymes, notamment le gène *CASP-2*. L'épissage alternatif de ce gène génère plusieurs isoformes dont les effets peuvent être opposés. Nous avons montré que, dans des cellules exposées aux agonistes de Fas, l'isoforme longue participe à l'activation de la procaspase-8 sans interagir directement avec les éléments constitutifs du complexe d'activation de la mort cellulaire appelé DISC. Une isoforme plus courte interfère avec la condensation de la chromatine et les modifications membranaires associées à l'apoptose des cellules U937 traitées par l'étoposide. La cystéine catalytique du motif QACRG de cette procaspase-2S semble nécessaire à cet effet. Nous avons identifié une nouvelle isoforme de la caspase-2 capable d'interagir avec la procaspase-2L et la molécule adaptatrice RAIDD. La surexpression de cette isoforme protège partiellement les cellules Namalwa de la mort cellulaire induite par des agents cytotoxiques et des agonistes des récepteurs de mort cellulaire. Les mutations qui préviennent l'interaction de cette isoforme avec RAIDD suppriment cet effet biologique. La procaspase-2 est une enzyme qui n'est indispensable ni au développement ni à l'apoptose mais qui module certains aspects de la mort cellulaire en accélérant ou en freinant le processus en fonction de l'isoforme synthétisée.

Identification of caspases implicated in apoptosis of human leukemic cells: role and function of caspase-2 isoforms.

Caspases are evolutionary conserved enzymes, some of them playing an effector role in apoptosis. In tumor cells treated with cytotoxic drug, we have observed a transcriptional increase of some genes encoding caspases, namely *CASP-2* gene. Alternative splicing of *CASP-2* mRNA generates several isoforms whose effects can be opposite. We have shown that, in leukemic cells exposed to Fas agonists, the long isoform participates to caspase-8 activation without directly interacting with the death inducing signaling complex (DISC). The short isoform interferes with chromatin condensation and membrane changes in U937 cells treated with etoposide. The cystein in the consensus QACRG motif of procaspase-2S is required for this effect. We have identified an additional isoform of caspase-2 that can interact with the procaspase-2L and the adaptor protein RAIDD. In Namalwa cells, overexpression of this new isoform delays apoptosis induced by cytotoxic drugs and death receptor agonists. Mutations that prevent interaction with RAIDD abrogate this biologic effect. Procaspase-2 is not essential for development and apoptosis but it exerts a subtle effect by modulating apoptosis depending on the synthetized isoform .

Discipline : Science de la Vie et de la Santé. Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mots-Clés : Apoptose - Leucémie - Caspases - Isoformes de la caspase-2

Intitulé et adresse des laboratoires :

Unité INSERM 517 - Mort Cellulaire et Cancer
Faculté de Médecine et de Pharmacie
7, bd Jeanne d'Arc - 21000 DIJON - FRANCE

Centre de Recherche du C.H.U.M.
Institut du Cancer de Montréal
1560 Sherbrooke Est
MONTREAL H2L 4M1, CANADA