

Université de Montréal

**ROLE DES CASPASES ET DES GRANZYMES DANS LA REGULATION
DE LA REPOSE IMMUNE: IMPLICATION DIFFERENTIELLE DANS
LA PROLIFERATION ET L'APOPTOSE DES LYMPHOCYTES T**

Par

Salah Mohammed Aouad

**Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures**

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

Janvier 2004

© Salah M. Aouad



QH

506

U54

2004

V.007

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:
ROLE DES CASPASES ET DES GRANZYMES DANS LA REGULATION
DE LA REPOSE IMMUNE: IMPLICATION DIFFERENTIELLE DANS
LA PROLIFERATION ET L'APOPTOSE DES LYMPHOCYTES T

Présentée par:
Salah Mohammed Aouad

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Président rapporteur: Dr Richard Bertrand
Directeur de recherche: Dr Rafick-Pierre Sékaly
Membre du jury: Dr Ivan Robert Nabi
Examineur externe: Dr Sophie Roy

SOMMAIRE

SOMMAIRE

L'activité protéolytique des caspases et les granzymes constitue l'appareil exécutif de l'immunité à médiation cellulaire, processus biologique qui mobilise les cellules T cytotoxiques (CTLs) pour protéger l'organisme contre les infections virales et le cancer. Dans ce manuscrit, nous exposons les travaux qui ont permis l'étude du comportement et de la contribution des caspases dans différentes phases de la réponse immune.

Nos travaux montrent que l'activation des lymphocytes T via le TCR induit l'activation de plusieurs caspases et la dégradation sélective de leurs substrats et ce, sans induire l'apoptose. Cette activation est déclenchée par TNFR, un récepteur qui active généralement les caspases pour induire l'apoptose des cellules T afin de désamorcer la réaction immunitaire. Nos données montrent aussi que l'activation des caspases dans cette phase précoce de la réponse est nécessaire au processus de prolifération des cellules T résultant de la ligation du TCR.

Par ailleurs, nous avons montré que l'activation de caspase-3 survient tôt dans l'apoptose induite par la réticulation de Fas. L'examen de la distribution sub-cellulaire de cette caspase a révélé son association avec la membrane plasmique au niveau des rafts ce qui corrobore son activation avant même la dépolarisation de la mitochondrie. Ceci suggère l'implication de caspase-3 dans l'initiation de l'apoptose via Fas. En effet, l'inhibition de cette caspase à l'aide d'un dominant négatif a permis de confirmer sa nécessité à l'initiation de l'apoptose des cellules T via Fas.

Finalement, nous nous sommes inspirés des mécanismes de la phase d'exécution de la réponse immune pour concevoir une chimère TAT-GrB, basée sur la capacité de transduction du peptide TAT du virus VIH-1 et l'activité cytolitique de granzyme B, afin d'étudier le rôle exact et déterminer la réelle contribution de cette sérine protéase à la cytolyse des cellules cibles par les CTLs. Les analyses biochimiques et fonctionnelles ont confirmé le succès de ce concept puisque la chimère s'accumule de façon autonome dans les cellules cibles et dégrade certaines molécules intracellulaires incluant caspase-3. La chimère induit aussi les altérations structurales et moléculaires associées à l'apoptose, telles que l'exposition de la phosphatidylsérine ou la fragmentation de l'ADN, démontrant ainsi son activité cytolitique. Cette cytolyse résulte de la dégradation directe des substrats de mort et ne semble pas impliquer les caspases. Par ailleurs, la chimère proposée a réussi à induire l'apoptose dans une variété de lignées cancéreuses incluant celles susceptibles de déjouer la réponse immune en interférant avec les caspases.

Mots clés: Réponse immune
Lymphocyte T
Apoptose
Prolifération
Caspase; Granzyme
TNFRs
Rafts
Mitochondrie
TAT

SUMMARY

The proteolytic activities of caspases and granzymes are essential for the execution of cell-mediated immunity, a process by which cytotoxic T lymphocytes (CTLs) control the onset and the spread of tumors and viral infections. The work presented in this thesis aims at defining the behavior and the contribution of caspases to different stages of this response.

Our results show that TCR crosslinking induces the activation of several caspases and selective degradation of their substrates without leading to apoptosis of T lymphocytes. This activation is triggered by TNFR, a receptor that normally activates caspases to induce T cell death required for the downregulation of the immune response. Our work revealed also that the activation of caspases during this early phase of the immune response is required for the TCR-induced proliferation of T lymphocytes.

Furthermore, we have shown that caspase-3 activation is an early event in Fas-mediated apoptosis of T lymphocytes. Analysis of the sub-cellular distribution of this caspase revealed its association with lipid-rich plasma membrane domains, rafts, which explains its early activation prior to the mitochondrial depolarization and suggests its involvement in the initiation of Fas-mediated apoptosis. Indeed, inhibition studies using a dominant negative version of caspase-3 demonstrated the absolute requirement of this caspase for the initiation of death signals stemming from Fas in T lymphocytes.

Finally, we took advantage of the apoptotic activity of granzyme B and the transducing capacity of the HIV-1 TAT peptide to generate a chimerical recombinant protein, TAT-GrB, in order to define the specific role and the individual contribution of this protease to the cytolytic activity of CTLs. Biochemical and functional analysis have confirmed the success of this concept since the chimera is able to accumulate autonomously inside target cells and cleave intracellular molecules including caspase-3. The chimera is able to induce structural and molecular alterations such as phosphatidylserine exposure and DNA fragmentation, demonstrating the cytolytic activity of this molecule. This cytolysis results from the direct degradation of death substrates and does not seem to involve caspases. Furthermore, the fusion protein is able to induce apoptosis in a variety of tumor cells including those capable of evading immune attacks through the obstruction of caspase-dependent death pathways.

Keywords: Immune response

T lymphocyte

Apoptosis

Proliferation

Caspase

Granzyme

TNFRs

Rafts

Mitochondrion

TAT

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRES

Sommaire	III
Summary	V
Table des matières	VI
Liste des tableaux	X
Liste des figures	XI
Liste des abréviations	XIII

INTRODUCTION

I- Mécanismes de la défense immunitaire	2
II- L'apoptose	3
1. Définition de l'apoptose	3
2. Traits morphologiques de l'apoptose	4
3. Traits moléculaires et biochimiques de l'apoptose	4
III- Mécanismes d'induction de l'apoptose lors de la réponse immune	5
1. La voie des récepteurs de mort et les caspases	5
1.1. Les récepteurs TNFRs et leurs ligands TNFs	5
<i>1.1.a. Identification et classification des ligands TNFs</i>	5
<i>1.1.b. Identification et classification des TNFRs</i>	6
<i>1.1.c. Expression et rôles physiologiques des TNFs et leurs récepteurs TNFRs</i>	8
<i>1.1.d. Régulation externe des DRs par les Decoy Receptors</i>	8
1.2. Mécanismes de signalisation apoptotique des TNFR à travers les caspases	8
1.2.1. Phase d'initiation des signaux apoptotiques via les DRs	8
<i>1.2.1.a Intégration des caspases dans la signalisation des DRs</i>	9
<i>1.2.1.b L'exception de Fas: Deux types d'intégration des caspases</i>	9
<i>1.2.1.c. Les voies de signalisations parallèles ou secondaires à l'apoptose</i>	11
<i>1.2.1.d. Régulation de la phase d'initiation de l'apoptose via les DRs</i>	12
1.2.2. Phase d'exécution des signaux apoptotiques via les DRs: activation de la cascade protéolytique des caspases	12
<i>1.2.2.a. Structure des caspases</i>	13
<i>1.2.2.b. Activation des caspases</i>	15
<i>1.2.2.c. Fonction et spécificité des caspases</i>	16

1.2.2.d. <i>Les substrats des caspases</i>	17
1.2.2.e. <i>Régulation des caspases</i>	17
FLIP (FLICE-Inhibitory protein)	19
CrmA (Cytokine response modifier A)	19
P35	20
La famille des IAPs	20
SMAC/DIABLO	22
La famille de Bcl-2	22
2. La voie des granules cytotoxiques et les granzymes ou voie d'exocytose	25
2.1. Contenu et fonction des granules	25
2.1.1. Perforine	25
2.1.2. Granulysine	25
2.1.3. Calreticuline	25
2.1.4. Les protéoglycans	25
2.1.5. Rab-27	25
2.1.6. Cytokines et chemokines	26
2.1.7. Les granzymes	26
2.1.7.a. <i>Structure des granzymes</i>	26
2.1.7.b. <i>Effets biologiques</i>	26
2.1.7.c. <i>Régulation des granzymes</i>	28
2.2 Mécanismes d'induction de l'apoptose par la voie d'exocytose	28
IV- Implication physiologique et pathologique de l'apoptose dans la réponse immune	30
1. Rôles physiologiques de l'apoptose dans la réponse immune	30
1.1 Rôle de l'apoptose dans l'exécution de la réponse immune	30
1.1.a. <i>L'apoptose comme mécanisme de surveillance anti-virale</i>	30
1.1.b. <i>L'apoptose comme mécanisme de surveillance anti-tumorale</i>	30
1.2. Rôle de l'apoptose dans le contrôle et le désamorçage de la réponse immune	31
2. Pathologies liées à l'apoptose dans la réponse immune	32
2.1. Pathologies liées à un défaut dans l'exécution de la réponse immune	32
2.1.a. <i>Les maladies infectieuses</i>	32
<i>Altération de la surveillance anti-virale</i>	32
<i>Immunodéficiences: Le syndrome d'immunodéficiência acquise (SIDA)</i>	32
2.1.b. <i>Le cancer: Altération de la surveillance anti-tumorale</i>	33

2.2. Pathologies liées à un défaut dans le contrôle de la réponse immune: auto-immunité ou révolte contre le soi	34
2.2.1. Auto-immunité systémique	34
2.2.1.a. <i>Le syndrome d'auto-immunité lymphoproliférative (ALPS)</i>	34
2.2.1.b. <i>La lymphohistiocytose haemophagocytaire familiale (FHL)</i>	34
2.2.2. Auto-immunité organe-spécifique	35
2.2.2.a. <i>Le diabète (IDDM)</i>	35
2.2.2.b. <i>La sclérose en plaque (MS)</i>	35
2.2.2.c. <i>Le syndrome de Sjogren (SS)</i>	35
2.2.2.d. <i>La thyroïdite d'hashimoto (HT)</i>	35
2.2.2.e. <i>La polyarthrite rhumatoïde (RA)</i>	36
2.2.3. Autres facteurs contribuant aux maladies auto-immunes	36

OBJECTIFS ET JUSTIFICATION DES TRAVAUX

I- Implication des caspases dans l'initiation de la réponse immune	38
II- Implication des caspases dans le désamorçage de la réponse immune	38
III- Génération d'une chimère TAT-granzyme B dotée d'une double capacité de transduction et d'induction d'apoptose	39

RESULTATS

Premier chapitre

Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in non-apoptotic cells	41
---	----

Deuxième chapitre

Caspase-3 is a component of Fas DISC in lipid rafts and its activity is required for complete caspase-8 activation during Fas-mediated cell death	83
---	----

Troisième chapitre

Generation of a novel fusion protein, TAT-granzyme B, with a dual capacity of transduction and apoptosis induction	116
--	-----

DISCUSSION

I- Mécanismes d'activation des caspases dans les lymphocytes T non-apoptotiques	156
II- Mécanismes qui protègent les cellules T de l'activité protéolytique des caspases et des granzymes	157
1. Mécanismes contrôlant l'activité pro-apoptotique des caspases	157
1.1. Rôle des voies de signalisation de NF-κB et des kinases	157
1.2. Rôle des inhibiteurs des caspases	158
2. Mécanismes contrôlant l'activité cytolytique des granzymes	160
III- Contribution des caspases au processus de la prolifération des lymphocytes T induit par la ligation du TCR	160
1. Indices et preuves moléculaires de l'implication des caspases dans la prolifération des cellules T	161
2. Mécanismes potentiels de contribution des caspases à la prolifération	162
<i>2.1.a. Implication des caspases dans l'activation des voies transcriptionnelles: NF-κB et MAPK</i>	162
<i>2.1.b. Implication des caspases dans la production de cytokines</i>	162
<i>2.1.c. Implication des caspases dans la restructuration cellulaire lors de la mitose</i>	163
<i>2.1.d. Implication des caspases dans le cycle cellulaire</i>	164
IV- Mécanismes susceptibles de diriger l'activité protéolytique des caspases vers l'exécution de l'AICD	165
1. Mobilisation différentielle des DRs	165
2. Redistribution sub-cellulaire des caspases	166
V- Conclusion générale	167
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	171

LISTE DES TABLEAUX**INTRODUCTION**

Tableau 1. Quelques substrats de caspases	18
--	----

RESULTATS

Troisième chapitre

Table 1. Screening of additional tumor cell lines for their sensitivity to TAT-GrB mediated cytotoxicity	153
---	-----

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1. La famille des TNFs et leurs récepteurs TNFRs	7
Figure 2. Les voies moléculaires qui polarisent la ligation des DRs vers la survie ou la mort des cellules	10
Figure 3. Représentation schématique des membres de la famille des caspases	14
Figure 4. Représentation schématique des membres de la famille des IAPs	21
Figure 5. Représentation schématique des membres de la famille de Bcl-2	24
Figure 6. La voie d'exocytose: les différents modèles d'accès de GrB aux cellules cibles	29

RESULTATS

Premier chapitre

Figure 1. The general caspase inhibitor zVAD blocks anti-CD3 induced T cell activation	73
Figure 2. Caspase-3 is cleaved into multiple fragments in stimulated Lymphocytes.	75
Figure 3. Caspase-3 activation occurs in various lymphocyte subsets.	76
Figure 4. Selective downstream caspase processing in activated lymphocytes	77
Figure 5. Caspase-8 is cleaved in activated lymphocytes whereas caspase-9 remains as a proenzyme.	78
Figure 6. Caspase activation results in selective substrate cleavage.	79
Figure 7. Substrate processing during T cell activation is caspase-dependent and is different than following apoptosis.	80
Figure 8. Caspase and substrate cleavage occur in non-apoptotic cells.	81

Annexe du premier article

Figure annexe. L'activation des caspases suite à la ligation du TCR résulte de la co-stimulation des cellules T via TNFR	82
---	----

Deuxième chapitre

Figure 1. Fas-induced processing of caspase-3 into p20 cleavage Product occurs despite blockade of mitochondrial events	109
Figure 2. Caspase-3 and other apoptotic molecules are associated with	

Lipid rafts in resting Jurkat cells and peripheral blood T lymphocytes	110
Figure 3. Fas ligation induces an increase in caspase-3 levels in lipid rafts	111
Figure 4. Analysis of the Fas-signaling complex (DISC) in the Jurkat cell line	112
Figure 5. Caspase-3 cleavage producing the p20 species occurs early during Fas-induced apoptosis	113
Figure 6. Caspase-8 processing in response to Fas-induced apoptosis is inhibited by a dominant-negative form of caspase-3	114
Figure 7. The pre-assembly model	115

Troisième chapitre

Figure 1. Schematic representations of GrB primary structure and its cloning strategy in the pTAT vector	144
Figure 2. Characterization of fusion proteins	145
Figure 3. TAT-GrB fusion protein induces apoptosis in target cells	147
Figure 4. Cells expressing the serine protease inhibitor, PI9, are resistant to the cytotoxic activity of TAT-GrB	149
Figure 5. TAT-GrB fusion protein is able to trigger target cells suicide program	152
Figure 6. TAT-GrB fusion protein induces apoptosis in a wide variety of tumor cells	153
Figure 7. TAT-GrB transducing activity is able to bypass the need for GrB receptor, MPR, for its entry to target cells	154

DISCUSSION

Figure 7. Mécanismes potentiels qui dirigent l'activité protéolytique des caspases vers la prolifération ou l'exécution de l'AICD des lymphocytes T	170
--	-----

LISTE DES ABREVIATIONS

AICD	Activation-induced cell death
AIF	Apoptosis-inducing factor
ALPS	Autoimmune lymphoproliferative syndrome
Apaf-1	Apoptosis protease-activating factor 1
APC	Antigen-presenting cells
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2
BCR	B cell receptor
CAD	Caspase-activated DNase
CARD	Caspase-recruitment domain
Caspase	Cysteiny aspartate-specific proteinase
CED	Cell death abnormal
CIAP	Cellular inhibitor of apoptosis
CI-MPR	Cation-Independent Mannose Phosphate Receptor
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomegalovirus
CRD	Cystein rich domain
Crm A	Cytokine response modifier A
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
DAXX	Death-associated protein 6
DcR	Decoy receptor
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DFF	DNA-fragmentation factor
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pI
DISC	Death-inducing signaling complex
DPPI	Dipeptidyl peptidase I
DR	Death receptor
EBV	Epstein-Barr virus
EDAR	Ectodysplasin receptor
Endo G	Endonuclease G

FADD	Fas-associated via death domain
FAF-1	Fas-associated protein factor-1
FAP-1	Fas-associated phosphatase
FLIP	FLICE-inhibitory protein
<i>gld</i>	Generalized lymphoproliferative disorder
Granzyme	Granule-associated enzyme
IAP	Inhibitors of apoptosis
ICE	IL-1 β -converting enzyme
IL-1β	Interleukine-1 β
LCMV	Lymphocytic chorio meningitis Virus
<i>lpr</i>	Lymphoproliferation
MTP	Mitochondrial transmembrane potential
NK	Natural killer
NF-κB	Nuclear factor kappa B
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
Perforin	Pore-forming protein
PI9	Proteinase inhibitor 9
PLAD	Pre-association ligand domain
PS	Phosphatidylserine
Rab-27a	Ras-associated protein a
RFC-140	Replication factor C-140
RIP	Receptor-interacting protein
SMAC	Second mitochondrial activator of apoptosis
SODD	Silencer of DD
SPI6	Serine proteinase inhibitor 6
TAT	Viral transcriptional transactivator
TCR	T cell receptor
TILs	Tumor-infiltrating lymphocytes

TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	TNF receptor
TRADD	TNF receptor 1-associated death domain protein
TRAF	TNF receptor-associated factor
WAS	Wiskott-Aldrich syndrome
XEDAR	X-linked ectodysplasin receptor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail qui a été réalisé au laboratoire d'immunologie à l'Université de Montréal, je tiens à exprimer à mon Directeur de recherche, Dr Rafick-Pierre Sékaly, ma reconnaissance et ma gratitude les plus profondes pour m'avoir accepté au sein de son équipe ainsi que pour la bonne direction dont il a fait preuve tout au long de ce projet de thèse.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi aux personnes du laboratoire sans qui ma formation aurait été incomplète. Je cite Dr Luchino Cohen et Dr Antoine Alam. Je manifeste aussi mes remerciements aux collègues, Dr Catherine Riou et Dr Elias Haddad pour leur contribution à certains travaux de cette thèse.

Finalement, je manifeste mes remerciements et mon amitié à l'adjointe administrative du Dr Sékaly, Carmen Estrela, pour son engagement sur le plan administratif ainsi que la compréhension et la patience dont elle a fait preuve tout au long de cette thèse.

Je profite de cette rubrique, pour adresser mes vifs remerciements aux Dr Sophie Roy, Dr Richard Bertrand et Dr Robert Nabi d'avoir accepté d'évaluer ce travail et participé activement à rehausser sa qualité.

DEDICACE

*Je dédie ce travail à ceux qui m'ont accompagné dans cette épreuve,
mon épouse Amal
ma fille chérie, Samya,
ma mère et mes beaux-parents
ainsi que mes deux sœurs
qui n'ont jamais manqué
d'encouragements.*

Finalement, à mon père là où il est à présent.

INTRODUCTION

Le système immunitaire assure la défense de l'organisme contre l'apparition et la propagation des cellules cancéreuses et protège celui-ci contre les infections du type viral ou autres. Cette défense mobilise un ensemble de processus cellulaires et moléculaires hautement organisés dans le temps qui sont communément groupés sous le nom de "réponse immune".

I- Mécanismes de la défense immunitaire

La réponse immune fait appel à une série de cellules hématopoïétiques spécialisées incluant les lymphocytes B, les lymphocytes T, les natural killers (NK), les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques, ayant en commun les mêmes précurseurs cellulaires provenant de la moelle osseuse. Grâce à leur capacité phagocytaire, les macrophages et les neutrophiles constituent la première ligne de défense de cette réponse contre plusieurs pathogènes. Cependant, cette défense sans sélectivité apparente, appelée immunité innée, reconnaît seulement certains traits invariables communs à quelques pathogènes et est incapable de protéger l'organisme contre les pathogènes intracellulaires complexes et dotés de capacité de renouvellement comme les virus. Ces infections complexes mobilisent une réponse plus sélective et spécialisée appelée, immunité acquise, dont l'exécution nécessite des cellules capables de respecter ces critères de sélectivité, telles que les lymphocytes T et B. La base moléculaire de cette spécificité réside dans les récepteurs TCR (T Cell receptor) et BCR (B Cell Receptor) des lymphocytes T et B dont la fonction principale est la reconnaissance des pathogènes. Chaque lymphocyte T ou B exprime à sa surface plusieurs exemplaires d'une copie unique du récepteur, qui n'est exprimée par aucun autre lymphocyte dans l'organisme, et qui est spécifique pour un antigène donné du pathogène. Tenant compte du nombre incalculable de lymphocytes dans un organisme, la somme de ces récepteurs constitue un répertoire de spécificité permettant la reconnaissance et la réponse contre une variété illimitée d'antigènes.

Les lymphocytes sont en patrouille permanente entre la circulation sanguine et les organes lymphatiques tels que les ganglions et la rate où la réaction immune est déclenchée par la rencontre des lymphocytes avec de nouveaux antigènes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (APC) telles que les cellules dendritiques ou les macrophages dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La variété dans la nature, la composition et le comportement des parasites dicte non seulement les mécanismes de leur reconnaissance par le système immunitaire mais aussi les mécanismes d'élimination de ceux-ci. Ainsi les pathogènes cantonnés dans les espaces extracellulaires ou libres dans la circulation sanguine sont directement accessibles aux anticorps des lymphocytes B qui les lient avidement et neutralisent

leur effet nuisible en facilitant leur phagocytose par les macrophages ou leur destruction directe par le complément. Cependant, les parasites intracellulaires comme certaines bactéries et la majorité des virus sont la cible des lymphocytes T qui, dans leur processus de défense, préfèrent sacrifier les cellules infectées par apoptose.

La fraction infime des lymphocytes T activés lors d'une infection, n'étant pas suffisante pour chasser la menace, prolifère afin d'amplifier les clones spécifiques. Cette expansion clonale est accompagnée par la différenciation des lymphocytes T activés qui se manifeste par l'expression d'une série de gènes incluant les gènes pro-apoptotiques nécessaires à l'exécution de la réponse^{1;2}. Ainsi la sous-population CD8 des lymphocytes T se différencie en cellules effectrices appelées CTLs (Cytotoxic T Lymphocytes) qui agissent de concert avec les natural killers (NK) pour exécuter la défense proprement dite en éliminant les cellules infectées ou tumorales par apoptose. La deuxième sous-population de lymphocytes T, CD4 (Helper), sert à assister les autres cellules (CD8, NK, lymphocytes B et les macrophages) en produisant des facteurs de croissance et des cytokines. Les CTLs et les NK utilisent deux voies distinctes d'apoptose pour éliminer les infections: la voie des récepteurs de mort (TNFRs ou DRs) et celle des granules cytotoxiques. Ces deux voies mobilisent deux grandes familles d'enzymes, les cystéine protéases du type caspases et les sérine protéases du type granzymes dont l'activité protéolytique constitue le mécanisme moléculaire de l'exécution de la réaction immune^{3;4}.

Une fois la menace de l'infection écartée, le système immunitaire entame le désamorçage de la réaction immunitaire en réduisant le nombre des lymphocytes car la prolifération incontrôlée de ceux-ci augmente le risque de cancer lymphatique et/ou le développement de maladies auto-immunes. Cette forme d'apoptose appelée AICD (Activation-Induced Cell Death)¹ s'effectue par les lymphocytes T eux-mêmes de façon autocrine (suicide) ou paracrine (fratricide) et fait appel aux mêmes voies d'apoptose qui ont servi lors de la défense.

II- L'apoptose

1. Définition de l'apoptose

La mort cellulaire programmée, ou apoptose, est un processus physiologique nécessaire au développement et au maintien des organismes multicellulaires car il assure le contrôle et la régulation du nombre de cellules de l'organisme^{5;6}. Ce processus de mort consiste en une séquence d'altérations morphologiques, structurales et moléculaires reproductibles et ordonnées dans le temps. C'est en 1890 que la mort cellulaire a été découverte pour la première fois par Sir William Councilman⁷. Plusieurs décennies plus tard, des analyses de microscopie ont permis à Kerr et ses collègues de

mieux caractériser ce phénomène biologique. Ils l'ont appelé apoptose, mot grec qui signifie la chute des feuilles des arbres pendant l'automne^{6;8}. Les études génétiques et moléculaires ultérieures ont montré que ce phénomène représente une forme de suicide cellulaire où la cellule exécute sa propre désintégration en activant un programme de mort génétiquement régulé et conservé parmi les organismes supérieurs^{9;10}.

2. Traits morphologiques de l'apoptose

Les analyses de microscopie électronique ont décelé dans les cellules apoptotiques des modifications morphologiques et structurales majeures incluant la condensation de la chromatine, celle du noyau et la circonvolution de ce dernier ainsi que contraction prononcée du cytoplasme. L'ensemble de ces transformations réduit considérablement la taille de la cellule qui subit un genre d'implosion qui lui fait perdre son contact avec les cellules voisines. La membrane plasmique subit des constriction (blebbing) qui vont ultérieurement diviser la cellule en petits corps apoptotiques concentrés en organites condensés. A l'inverse de la nécrose, une forme de mort pathologique qui entraîne l'éclatement des cellules provoquant l'inflammation des tissus touchés, l'apoptose préserve l'intégrité des cellules malgré toutes les transformations morphologiques citées ci-dessus⁸.

3. Traits moléculaires et biochimiques de l'apoptose

Les transformations morphologiques et structurales recensées lors de l'apoptose résultent, en réalité, d'un certain nombre d'altérations moléculaires incluant une série de dégradations et redistributions de molécules vitales ainsi que la désorganisation de certaines structures cellulaires. La dégradation des lamines A, B et C, protéines structurales du noyau, entraîne le désassemblage de la matrice nucléaire, la condensation de la chromatine ainsi que la contraction du volume nucléaire¹¹⁻¹³. La dégradation de la protéine nucléaire NuMA résulte en la condensation de la chromatine^{14;15}. L'ADN subit aussi une dégradation à l'échelle génomique en fragments de très grande taille allant de 50 à 300 kilobases puis à une échelle beaucoup plus réduite, au niveau internucléosomale, en fragments de 180 à 200 paires de bases⁸. Cette deuxième forme d'altération d'ADN est usuellement appelée fragmentation d'ADN (laddering).

On détecte aussi des altérations au niveau du cytoplasme. Des protéines du cytosquelette telles que l'actine et la β -caténine nécessaire à la structure, la motilité et aux interactions intercellulaires sont dégradées lors de l'apoptose ce qui explique une fois de plus les altérations morphologiques citées ci-dessus¹⁶. La mitochondrie

accuse une chute du potentiel transmembranaire ($\Delta\psi$) suite à l'égalisation des charges de part et d'autre de sa membrane résultant en l'ouverture de larges pores¹⁷⁻¹⁹. Cette ouverture permet aussi la libération dans le cytosol d'une série de molécules incluant le cytochrome c qui assure la respiration oxydative nécessaire à l'apport des cellules en énergie^{20;21}.

La polarité de la membrane plasmique est aussi altérée. Ainsi la phosphatidylsérine (PS), une molécule associée à la face interne de la membrane plasmique, se trouve exposée à la surface extracellulaire lors de l'apoptose. Cette exposition de la PS à la surface des cellules apoptotiques semble participer dans la reconnaissance des cellules apoptotiques et leur élimination par les cellules phagocytaires²². A cet égard, l'apoptose se distingue encore une fois de la nécrose car elle veille à la disparition des cellules mortes de la circulation évitant ainsi tout dommage aux tissus touchés.

Il faut rappeler que les transformations structurales et moléculaires telles que la fragmentation de l'ADN, la chute du $\Delta\psi$ mitochondrial ou encore l'exposition de PS, sont à la base des techniques standards utilisées actuellement dans la détection de l'apoptose dans divers systèmes expérimentaux.

III- Mécanismes d'induction de l'apoptose lors de la réponse immune

Les deux voies majeures d'induction de l'apoptose utilisées par le système immunitaire dans sa fonction de défense de l'organisme sont les suivantes:

- 1- La voie des récepteurs de mort DRs (Death Receptors) appartenant à la famille des récepteurs membranaires TNFR (Tumor Necrosis Factor) dont la réticulation à l'aide de ligands spécifiques induit une cascade protéolytique menant à la désintégration de la cellule cible. Cette voie est exécutée exclusivement par les cystéine protéases du type caspases.
- 2- La voie d'exocytose des granules cytotoxiques, qui en déversant leur contenu riche en protéases, entraînent la mort par apoptose de la cellule cible. Cette voie fait appel aux sérine protéases du type granzymes qui peuvent induire l'apoptose directement ou par le biais des caspases.

1. La voie des récepteurs de mort et les caspases

1.1. Les récepteurs TNFRs et leurs ligands TNFs

1.1.a. Identification et classification des ligands TNFs

La première indication de l'existence d'un facteur à activité apoptotique provient de l'observation faite en 1868 par Brunes chez des patients dont les tumeurs subissaient occasionnellement des régressions spontanées suite à des infections²³. Un

siècle plus tard, le facteur à l'origine de ces régressions a été identifié et nommé TNF (Tumor Necrosis Factor)²⁴. Deux formes de TNF, TNF α et TNF β (Lymphotoxin α , LT α) ont été isolées à partir des lymphocytes T activés et les macrophages^{25;26}. Ces protéines sont devenues représentatives d'une nouvelle famille de cytokines qui s'étend actuellement à une vingtaine de membres dont les plus établis sont: Fas L (Fas ligand), LT β , CD27 L, CD30 L, CD40 L et son homologue murin OX40 L, 4-1BB L, TRAIL, RANK L, TL1A, EDA-A1 et EDA-A2^{23;27}. Ces ligands sont des protéines membranaires du type II avec une région C-terminale extracellulaire et présentent seulement 20 à 25 % d'homologie essentiellement concentrée dans la région nécessaire à l'interaction avec leurs récepteurs respectifs. Bien qu'ils existent majoritairement sous forme membranaire trimérique ou multimérique nécessaire à l'agrégation de leurs récepteurs, quelques-uns de ces ligands, comme TNF α et TNF β , existent et agissent aussi sous forme soluble²³.

1.1.b. Identification et classification des TNFRs

Les récepteurs spécifiques aux ligands décrits ci-dessus sont légèrement plus nombreux et les interactions croisées sont assez courantes rendant le profil de liaison très complexe entre ces deux familles de protéines. Parmi ces récepteurs on trouve TNFR-I, TNFR-II, ayant chacun TNF α et TNF β comme ligands; Fas: récepteur de Fas L; CD27: récepteur de CD27 L; CD30: récepteur de CD30 L; CD40: récepteur de CD40 L; 4-1BB: récepteur de 4-1BB L; DR3: récepteur de TL1A; DR4 et DR5: récepteurs communs à TRAIL et RANK: récepteur de RANK L (figure 1)^{23;27}.

Ces récepteurs sont des protéines membranaires du type I dont la région extracellulaire N-terminale présente une série de 2 à 6 domaines CRD (Cystein-Rich Domain) riches en cystéine nécessaires à l'interaction avec leurs ligands^{23;27}. Les analyses cristallographiques ont montré que la forme fonctionnelle des TNFRs est trimérique ou oligomérique stabilisée par des ponts disulfures entre les CRDs²⁸. On pensait que cette oligomérisation des récepteurs était seulement induite lors de l'interaction avec leurs ligands mais des données moléculaires récentes ont montré que ces récepteurs peuvent être pré-associés même en absence de leur ligand, et ce à l'aide de domaines extracellulaires, PLAD (pre-ligand association domains)^{27;29;30}. Plusieurs membres de cette famille tels que TNFR-I, Fas, CD27, CD30 et CD40 sont libérés sous forme soluble à l'aide de clivage par protéolyse, phénomène connu sous le nom de "shedding"³¹.

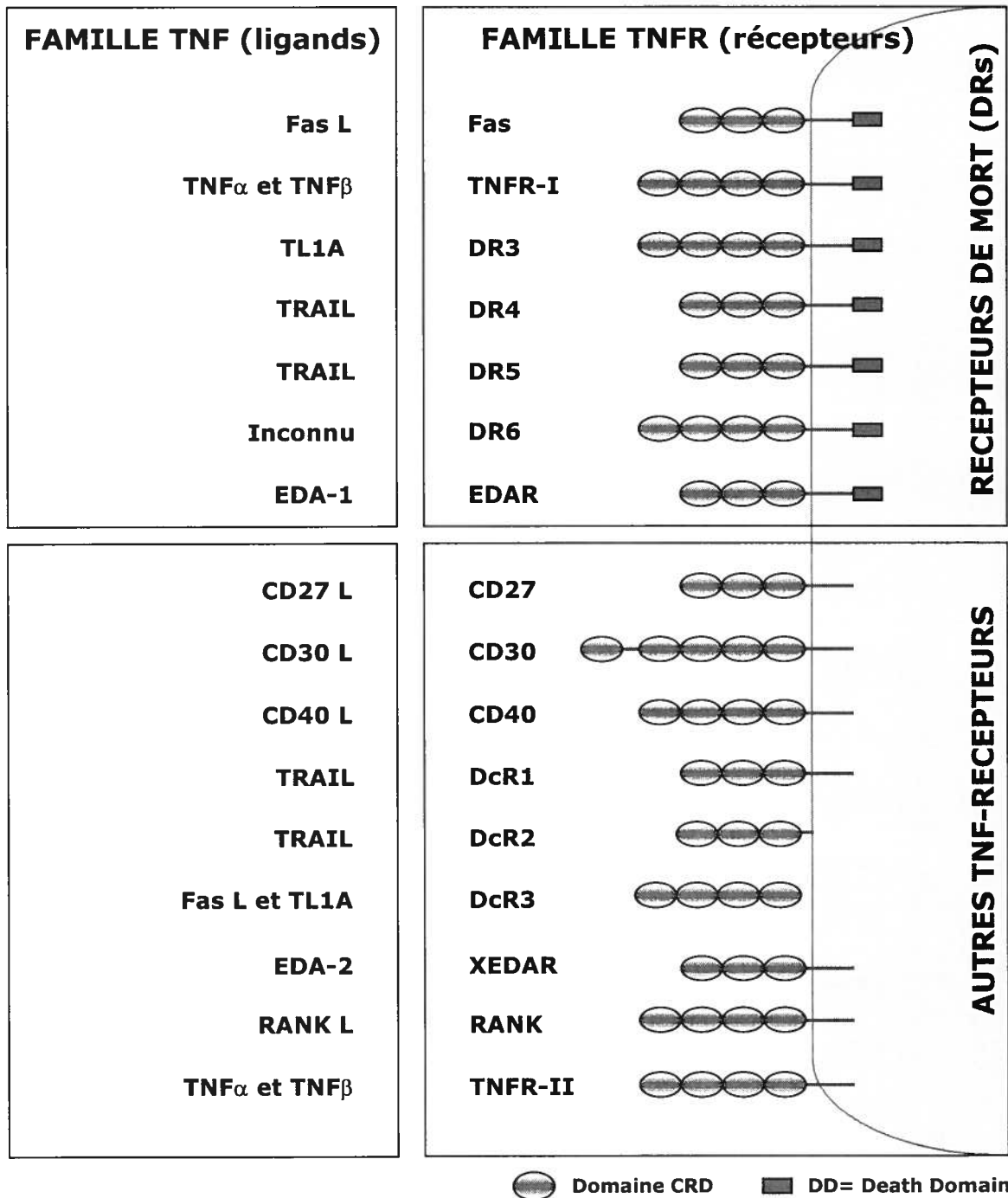


Figure 1. La famille des TNFs et leurs récepteurs TNFRs. La famille des TNFRs renferme plusieurs membres dont certains sont présentés dans cette figure (à droite de la planche). Deux traits structuraux distinctifs sont à la base de la classification de ces membres. Le premier réside dans la présence, dans la partie extracellulaire, d'une série de 3 à 5 domaines riches en cystéine (CRD). Le deuxième trait réside dans la présence d'un motif DD dans la région intracellulaire de certains membres de cette famille groupés sous le nom de DRs. Les ligands, TNF, de ces récepteurs sont présentés vis à vis de leurs récepteurs respectifs (à gauche de la planche). Il faut noter le profil complexe d'interaction entre ces deux familles de molécules. Certains ligands tels que TRAIL comptent jusqu'à quatre récepteurs. De même, certains récepteurs comme TNFR-I ont deux ligands. Schéma adapté de Locksley R.M. et al^{23;27}.

1.1.c. Expression et rôles physiologiques des TNFs et leurs récepteurs TNFRs

Les récepteurs TNFR et leurs ligands sont exprimés en grande partie par les cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T et B quiescents ou activés, ou encore les monocytes et les macrophages où ils assurent des fonctions variées allant des signaux de survie comme l'activation et la prolifération des cellules, aux signaux de mort par apoptose, en passant par des fonctions dans le développement et la différenciation des tissus. Ainsi les récepteurs TNFR-I, TNFR-II et Fas sont aussi capables d'induire l'apoptose que la prolifération alors que RANK semble être nécessaire au développement des ganglions lymphatiques secondaires³². Certains membres de cette famille remplissent aussi des fonctions de développement et de différenciation hors du cadre du système immunitaire, comme c'est le cas de EDAR et XEDAR qui sont impliqués dans la formation de la peau, des dents, des glandes sébacées et sudoripares ou encore RANK qui participe à la formation des glandes mammaires et des os^{33,32;34}.

1.1.d. Régulation externe des DRs par les Decoy Receptors

La famille des TNFRs compte un autre type de récepteurs qui sont incapables de transmettre des signaux ce qui fait d'eux des leurres ou DcR (Decoy Receptor) capables de détourner les ligands et les empêcher de signaler à travers leurs vrais récepteurs. DcR1 et DcR2 sont capables de séquestrer TRAIL inhibant ainsi la signalisation via DR4 et DR5³⁵⁻³⁹ alors que DcR3 inhibe la signalisation à travers Fas et DR3 en séquestrant Fas L et TL1A^{40;41}.

1.2. Mécanismes de signalisation apoptotique des TNFR à travers les caspases

1.2.1. Phase d'initiation des signaux apoptotiques via les DRs

A l'inverse des autres récepteurs, la région intracellulaire des DRs ne possède pas d'activité catalytique du type kinase ou phosphatase. Les délétions par mutagenèse ont montré que les signaux apoptotiques induits par TNFR-I nécessitent une séquence se trouvant dans la partie intracellulaire de ce récepteur appelée domaine de mort ou DD (Death Domain)⁴². Des analyses d'homologie ont identifié un domaine similaire sur Fas, DR3, DR4, DR5 et DR6 permettant ainsi de grouper cette sous-classe de TNFRs sous le nom de récepteurs de mort ou DRs (Death Receptors)⁴³⁻⁴⁷. Depuis, de nombreuses molécules, appelées molécules adaptatrices ou modulatrices capables d'interagir avec ces récepteurs via le DD, ont été identifiées (figure 2)⁴⁸. FADD/MORT-1 (Fas-Associated via DD), est une molécule capable de s'associer via son DD à Fas et TNFR-I suite à la ligation de ces derniers⁴⁹⁻⁵². Elle est aussi dotée d'un

autre motif, DED (Death Effector Domain), requis à la transmission du signal apoptotique via Fas et TNFR-I^{52;53}. Une autre protéine dotée d'un DD et capable de s'associer avec TNFR a été identifiée et appelée TRADD (TNFR 1-Associated DD molécule)⁵⁴.

1.2.1.a Intégration des caspases dans la signalisation des DRs

La première preuve de l'implication des caspases dans les signaux de mort induits par les DRs provient de la capacité d'un inhibiteur viral des caspases, CrmA, de bloquer l'apoptose induite par Fas et TNFR-I^{55;56}. Les expériences d'immunoprécipitations de Fas oligomérisé combinées au micro-séquençage "Nanoelectrospray tandem Mass Spectroscopy" ont permis d'identifier FLICE/caspase-8, une caspase dotée d'un motif DED similaire à celui de FADD. Cette découverte a permis d'élucider les mécanismes de transmission des signaux apoptotiques des DRs aux caspases d'une part et de situer caspase-8 à l'apex de la cascade protéolytique issue de la ligation des DRs d'une autre part^{51;57-59}. Plus tard, on a identifié une nouvelle caspase, caspase-10, ayant une structure très proche de caspase-8 et capable d'interagir aussi avec les DRs et d'initier leurs signaux de mort^{59;60}.

Ces deux découvertes majeures ont permis la reconstitution des voies de signalisation de Fas et TNFR-I comme suit. La ligation de Fas entraîne le recrutement de FADD à celui-ci par interaction homotypique entre leurs DDs respectifs. FADD recrute à son tour caspase-8/caspase-10 via les domaines DED formant ainsi un complexe tripartite de signalisation appelé DISC (Death-Inducing Signaling Complex) requis à l'activation de caspase-8/caspase-10 (figure 2)⁵¹. La signalisation du TNFR-1 et DR3 est légèrement différente puisque le recrutement de FADD et caspase-8 et/ou caspase-10 requiert l'association préalable de ce récepteur avec TRADD^{44;52;53}.

1.2.1.b L'exception de Fas: Deux types d'intégration des caspases

Plus tard dans le processus de caractérisation moléculaire de cette voie de mort, l'équipe de Krammer a montré que le degré d'intégration des caspases par les DRs dépendait du type cellulaire⁶¹. Ainsi la ligation de Fas chez les cellules du type-I permet le recrutement et l'activation de niveaux élevés de caspase-8 dans le DISC et entraîne l'activation directe des caspases en aval telles que caspase-3. Cependant, dans un autre type de cellules, dites du type-II, la ligation de Fas induit un très faible recrutement de caspase-8 et ne provoque pas l'apoptose aussi rapidement que dans les cellules du type-I. De plus, la surexpression de Bcl-2 ou de Bcl-xL protège ces cellules de l'apoptose via Fas démontrant ainsi la nécessité de la mitochondrie à l'amplification du faible signal de caspase-8 et l'exécution de l'apoptose dans ce type

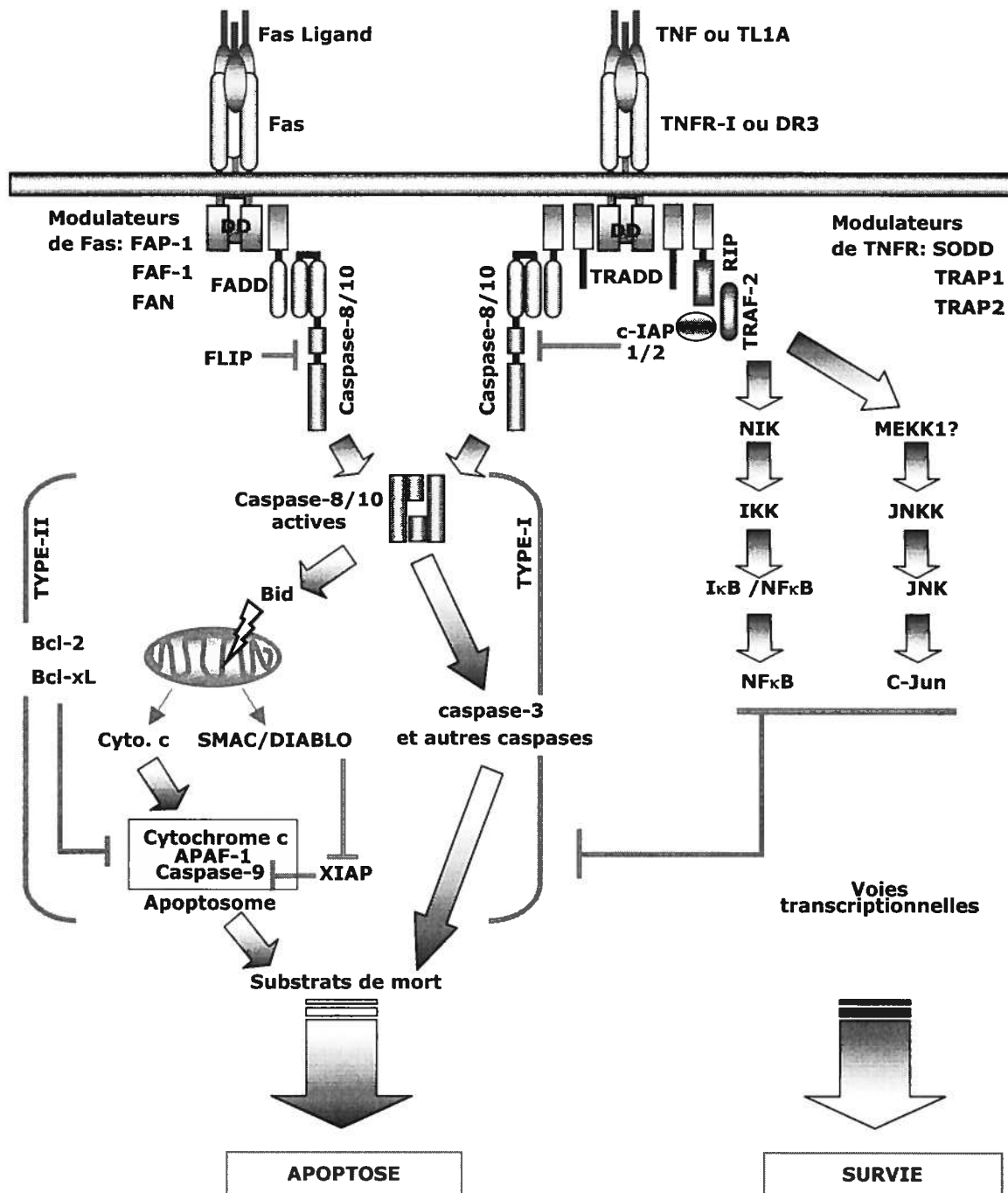


Figure 2. Les voies moléculaires qui polarisent la ligation des DRs vers la survie ou la mort des cellules. La réticulation de TNFRs à l'aide de leurs ligands TNF entraîne le recrutement de différentes molécules de signalisation via les domaines DD. La nature de la molécule recrutée constitue la base moléculaire de la polarisation du signal provenant des récepteurs vers la survie ou l'apoptose de la cellule. Ainsi le recrutement de FADD aux récepteurs DRs provoque le recrutement et l'activation de caspase-8 qui mène à la dégradation des substrats de mort et l'apoptose, soit directement via les autres caspases (cellules du type-I) soit à travers la mitochondrie (cellules du type-II). Le recrutement de RIP et TRAF-2 via TRADD au niveau du TNFR-I ou DR3 mène à l'activation des deux voies transcriptionnelles complémentaires NFκB et JNK qui assurent la survie de la cellule, en partie grâce à l'expression de gènes anti-apoptotiques. Schéma adapté de Lenardo M.J. et al; Ashkenazi A. et Dixit M.V⁴⁸.

de cellules⁶¹. A la lumière de cette découverte, les lymphocytes T activés via le TCR ont été classifiés parmi les cellules du type-II tenant compte de leur incapacité de former le DISC et leur expression élevée de Bcl-xL qui corrèle très bien avec leur résistance à l'apoptose induite par Fas⁶². Or, les thymocytes et les lymphocytes T provenant des souris *caspase-9^{-/-}*, *APAF-1^{-/-}*, *Bax/Bak^{-/-}* ou celles surexprimant Bcl-2 demeurent sensibles à l'apoptose induite par la ligation de Fas⁶³⁻⁶⁶, ce qui a rendu impossible la classification de ces cellules dans le type-II. Néanmoins, il faut rappeler que les lymphocytes T redeviennent sensibles à l'apoptose via Fas après une certaine durée d'activation. Cette sensibilisation a été corrélée récemment avec le regain de la capacité de ces cellules de former le DISC et la baisse des niveaux de Bcl-xL. L'ensemble de ces observations a permis de déduire que les lymphocytes T activés via le TCR sont du type-II et qu'au cours de leur processus d'activation ces cellules acquièrent les traits du type-I à savoir la diminution des niveaux d'expression de Bcl-xL ainsi que le regain de la capacité de former le DISC. C'est ce qui les sensibilise à l'apoptose induite par Fas et provoque leur élimination par AICD, un événement physiologique nécessaire au désamorçage de la réaction immunitaire⁶⁷.

1.2.1.c. Les Voies de signalisations parallèles ou secondaires à l'apoptose

D'autres molécules modulatrices sont capables d'interagir avec les DRs et contribuer à leur signalisation. DAXX (Death-Associated protein 6) est une molécule dépourvue de DD qui semble connecter Fas à l'apoptose via la voie des kinases JNK plutôt que les caspases^{68;68}. RIP (Receptor-Interacting Protein), une molécule adaptatrice qui s'associe à TRADD via son DD, permet de recruter caspase-2 via le motif CARD (Caspase Recruitment Domain) par le biais d'une autre molécule intermédiaire RAIDD/CRADD (RIP-Associated ICH1 Protein with DD/Caspase and RIP Adaptor with DD)^{69;70}.

Les récepteurs TNFRs ne sont pas restreints à l'induction de l'apoptose puisque TNFR-I, TNFR-II et DR3 sont capables d'induire des signaux pro-inflammatoires et immunomodulateurs ainsi que des signaux d'activation des lymphocytes T ou B (co-stimulation)^{71;72}. Ces signaux résultent de l'activation des voies transcriptionnelles de NF-κB ou JNK/AP-1 déclenchées par RIP et TRAF-2 (TNFR-Associated Factor-2), une autre molécule adaptatrice qui s'associe directement avec TNFR-II et indirectement avec TNFR-I via TRADD^{53;69;73}. A cet égard, TRADD semble servir de plate-forme moléculaire capable d'aiguiller le signal des DRs soit vers l'apoptose en recrutant FADD soit vers la prolifération et l'inflammation en recrutant TRAF (figure 2). Fas est aussi capable de générer des signaux de co-stimulation des lymphocytes T en activant NFκB

ou la voie de kinases ERK par le biais de FLIP (FLICE Inhibitory Protein), molécule recrutée dans le DISC via FADD^{74;75}.

1.2.1.d. Régulation de la phase d'initiation de l'apoptose via les DRs

Plusieurs autres molécules à activités biologiques variées, pourvues ou non de DD, sont capables d'interagir directement avec les DRs et semblent réguler la transmission de leurs signaux. Ces molécules peuvent être classifiées en deux groupes selon leur capacité d'intégrer les caspases dans leur fonction régulatrice. Le premier groupe consiste en trois protéines, cIAP-1, cIAP-2 et FLIP dont la fonction régulatrice implique les caspases. cIAP-1 et cIAP-2 sont capables de s'associer aux molécules TRAFs pour inhiber l'apoptose induite par TNFR mais on ne sait si cette inhibition résulte de leur interférence avec le recrutement des caspases au DISC ou bien de leur capacité d'inhiber les caspases directement. FLIP peut réguler les signaux des DRs en modulant l'activation de caspase-8⁷⁶ et/ou en activant NF- κ B⁷⁵.

Le deuxième groupe, celui qui module le signal indépendamment des caspases inclue FAP-1 (Fas-Associated Phosphatase), une tyrosine-phosphatase dont l'interaction avec Fas inhibe l'apoptose^{77;77}. FAF-1 (Fas-Associated protein Factor-1), une autre molécule qui se lie au DD de Fas semble amplifier la capacité apoptotique de ce dernier à l'aide d'un mécanisme encore inconnu. Quatre protéines s'associent avec TNFR-I et participent aussi à sa signalisation. On cite: FAN, une protéine impliquée dans l'activation de la sphingomyélinase neutre par TNFR-I⁷⁸. TRAP1, apparentée à hsp90 (heat shock protein 90) dont la fonction est encore inconnue⁷⁹ et TRAP2, un élément régulateur du protéasome^{80;81}. SODD (Silencer of DD) est une protéine à large distribution tissulaire associée aux DD de TNFR-I et DR3 au repos et s'en libère immédiatement après leur ligation suggérant un rôle de cette molécule dans la prévention d'une signalisation spontanée en absence de ligands⁸².

1.2.2. Phase d'exécution des signaux apoptotiques via les DRs: activation de la cascade protéolytique des caspases

Le terme caspase dérive du mot composé cysteiny aspartate-specific proteinase qui signifie: protéase dont le site catalytique renferme une cystéine active qui hydrolyse spécifiquement après un résidu aspartate (Asp)⁵⁹.

L'étude du nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) a révélé un nombre d'éléments génétiques, conservés à travers l'évolution, cruciaux à l'exécution et la régulation de l'apoptose. Ce ver est composé de 1090 cellules somatiques, un nombre qui, au cours du développement de cet organisme, sera réduit à 959 cellules. Les 131 cellules manquantes sont éliminées par apoptose. L'étude génétique de certains

mutants cellulaires *C. elegans* a débouché sur l'identification de 11 gènes dont trois, ced-3, ced-4 et ced-9 sont les protagonistes de cette forme de mort cellulaire⁸³. Ced-3 et ced-4 sont des gènes pro-apoptotiques alors que ced-9 est anti-apoptotique par le biais de l'antagonisme qu'il exerce sur ces deux gènes. Bien que ces gènes soient établis comme les principaux acteurs de la mort cellulaire chez *C. elegans*, leur fonction biologique était inconnue. Dans un domaine de recherche éloigné de l'apoptose, l'inflammation, une cystéine-protéase, requise à la maturation de la cytokine pro-inflammatoire interleukine-1 β (IL-1 β) a été identifiée et appelée ICE (IL-1 β -Converting Enzyme), actuellement connue sous le nom de caspase-1^{84;85}. Ce n'est qu'un an plus tard (1993) que la connexion entre cette cystéine protéases avec l'apoptose a été effectuée quand l'équipe de Horvitz a réalisé que cette protéase était en fait l'homologue humain de ced-3⁸⁶. Il est important de signaler que cette découverte réunie avec les travaux sur *C. elegans* ont eu un impact aussi bien sur la recherche fondamentale que le domaine médical, à un point tel qu'elles ont valu le prix Nobel de médecine de l'année 2002. Plus tard, les gènes Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor) et Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2) ont été identifiés comme les homologues humains de ced4 et ced9⁸⁷⁻⁸⁹. Ces découvertes ont non seulement révélé la conservation des mécanismes moléculaires de l'apoptose au cours de l'évolution mais elles ont aussi permis l'identification d'une longue série de protéases apparentées à ced-3 et ICE/caspase-1.

A ce jour, quatorze caspases (caspase-1 à 14) ont été identifiées chez les mammifères (figure 3)⁹⁰ dont onze clonées chez l'Homme sauf les caspases-11, 12 et 14 qui ont été identifiées seulement chez la souris^{91;92}. Sur le plan fonctionnel ces protéases peuvent être divisées en deux grandes familles. Les caspases impliquées dans l'apoptose telles que caspases-2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10 et celles qui sont plus apparentées à caspase-1 et qui semblent être impliquées davantage dans les réactions inflammatoires comme caspases-4, 5 et 11, étant donnée leur capacité de maturer certaines cytokines pro-inflammatoires. Les caspases-12, 13 et 14 ne sont pas encore classées car il n'y a pas assez de données fonctionnelles à leur propos quoique la structure primaire permet de classer caspases-12 et 13 avec les caspases inflammatoires et caspase-14 avec les membres pro-apoptotiques⁹²⁻⁹⁴.

1.2.2.a. Structure des caspases

Les caspases sont toutes synthétisées sous forme de précurseur de 30 à 50 kDa appelé pro-enzyme ou zymogène présentant trois domaines distincts séparés chacun par un ou deux sites de clivages nécessaires à l'activation de l'enzyme. Un premier domaine N-terminal ou prodomaine dont la nature varie considérablement en taille et

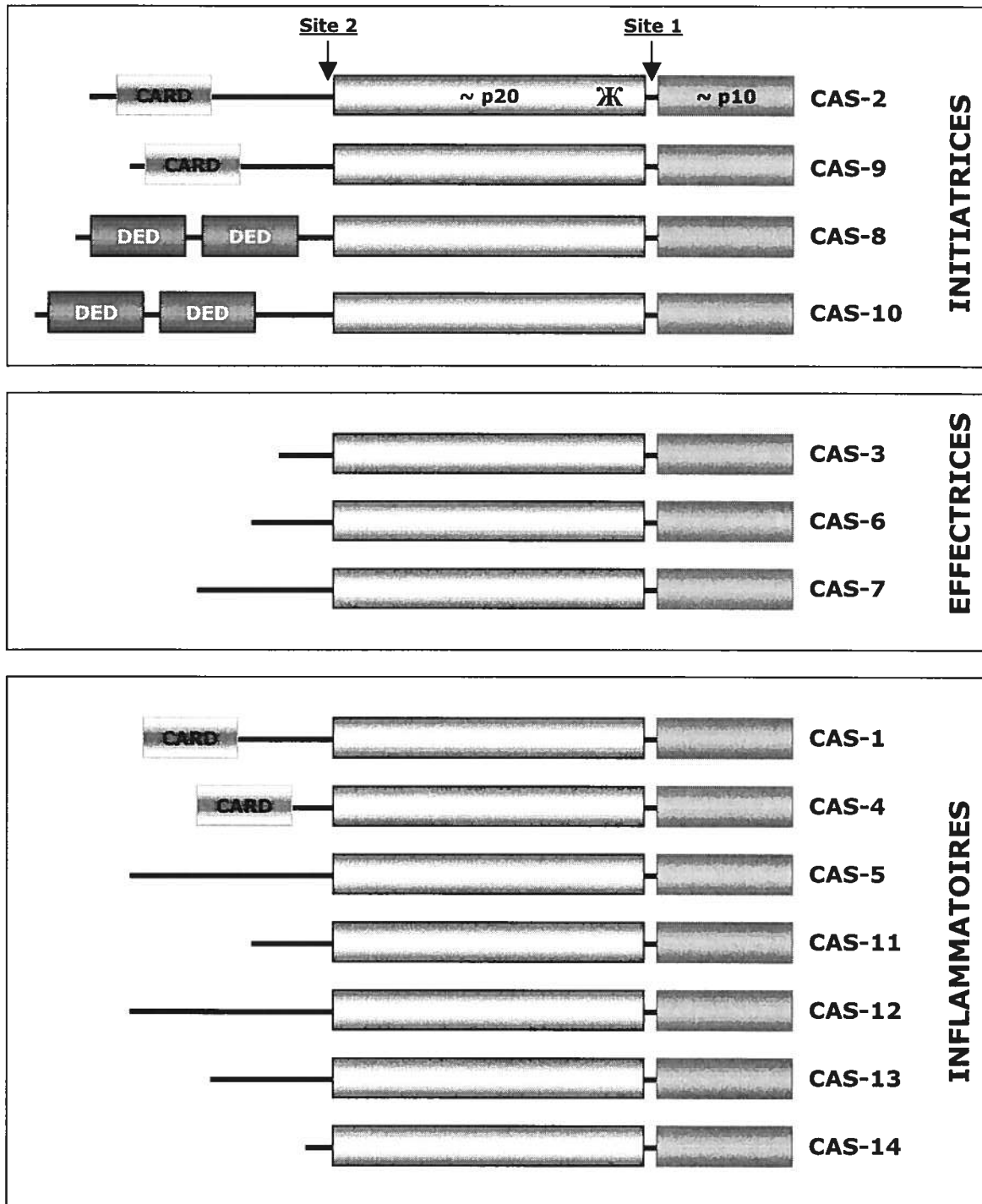


Figure 3. Représentation schématique des membres de la famille des caspases. Chaque membre est constitué de trois domaines majeurs séparés par des sites de clivages. Un domaine N-terminal, prodomaine, de taille et de séquence variable renferme selon le membre de cette famille un motif DED ou motif CARD. Les deux autres domaines catalytiques mieux conservés entre les caspases représentent une large sous-unité médiane dotée du site actif QACxG (Ж) et une petite sous-unité C-terminale. Les caspases peuvent être divisés en trois groupes fonctionnels. Le premier groupe est composé de caspases initiatrices de l'apoptose. Le deuxième renferme les caspases exécuteurs de l'apoptose et un troisième groupe renferme les caspases pro-inflammatoires. Schéma adapté de Strasser A¹⁸⁴.

en séquence. Les deux autres domaines, où réside l'homologie entre les caspases, consistent en une grande sous-unité d'environ 20 kDa (p20) contenant le site catalytique, ayant pour motif invariable (QACXG), suivie d'une petite sous-unité d'environ 10 kDa (p10).

Les caspases ont été classifiées en deux groupes selon la taille de leurs prodomaines. Le groupe I est composé de caspase-1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 avec de longs prodomaines mesurant jusqu'à 26 kDa (caspase-8). Dans ce groupe, le prodomaine est porteur de motifs conservés tels que le motif DED qui se trouve représenté deux fois dans caspases-8 et 10 et le motif CARD qui est largement distribué sur le reste des membres de ce groupe^{48;57;58;95}. Ces motifs sont requis au recrutement et l'activation issue de l'oligomérisation des caspases par des molécules adaptatrices dans les sites de signalisation. Le groupe II regroupe caspase-3, 6, 7 et 14 avec des prodomaines courts ne dépassant pas 3 kDa et dont la fonction est encore inconnue⁹⁶⁻⁹⁸.

Une fois le prodomaine libéré par protéolyse, la grande et la petite sous-unité forment un complexe pour générer une enzyme active. L'analyse du cristal de caspase-1 et caspase-3 montre qu'une caspase active forme un tétramère constitué de deux hétérodimères issus de l'association d'une petite et d'une grande sous-unité. Les deux hétérodimères sont alignés en conformation antiparallèle exposant les deux sites actifs de part et d'autre du tétramère⁹⁹⁻¹⁰¹. De ce fait, deux proenzymes d'une même caspase sont requis pour former une enzyme active.

1.2.2.b. Activation des caspases

Deux traits structuraux caractéristiques des caspases sont au centre de leur mécanisme d'activation, le prodomaine de certaines caspases et les sites de clivage du zymogène. Les proenzymes sont convertis à la forme active à l'aide de clivage protéolytique au niveau des sites séparant les trois domaines. Ces sites sont en fait des motifs tétrapeptidiques semblables à ceux trouvés sur les substrats des caspases. Ceci implique que l'activation des caspases s'effectue soit par auto-catalyse soit par catalyse croisée entre différentes caspases (trans-activation). Il existe au moins trois situations différentes d'activation des caspases.

a) Activation par recrutement: au niveau de la membrane plasmique, la ligation de récepteurs TNFRs comme Fas ou TNFR-I entraîne le recrutement de caspase-8 ou caspase-10 à ce récepteur à l'aide de FADD via les domaines DED. Au niveau du cytosol, la libération du cytochrome c résultant de la dépolarisation de la mitochondrie suite à la ligation des DRs ou un autre stimulus apoptotique, induit l'activation de caspase-9. Cette activation résulte de la formation d'un complexe (apoptosome) entre

le cytochrome c, le dATP et l'association de caspase-9 avec Apaf-1 via le domain CARD¹⁰². Ces deux exemples de recrutement obéissent au modèle "induced proximity model" qui suggère que la translocation d'une caspase à un site commun de signalisation avec une molécule adaptatrice ou un co-facteur entraînerait une élévation de la concentration locale du proenzyme à un point tel que l'activité résiduelle inhérente à celui-ci déclenche son activation par autocatalyse.

b) Trans-activation entre caspases: généralement ce type d'activation survient après le premier (activation par recrutement) dans des cascades protéolytiques suivant l'activation d'une caspase initiatrice comme caspases-8, 9 ou 10 qui vont ensuite activer les autres par protéolyse d'où la trans-activation.

c) Activation par une autre protéase: Granzyme B, une sérine protéase munie d'une activité aspartase, est aussi capable de cliver les caspases et les activer¹⁰³⁻¹⁰⁵. D'autres sérine protéases appartenant à la famille des cathepsines, telles que cathépsine B et cathépsine G, sont capables de cliver et activer les caspases¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

1.2.2.c. Fonction et spécificité des caspases

Les caspases font partie des protéases les plus spécifiques avec une exigence inégalée de clivage après un résidu Asp (position P1) dans la séquence peptidique de leurs substrats⁹⁰. Les caspases doivent aussi reconnaître trois résidus supplémentaires en amont du résidu P1 afin de dégrader leurs substrats. Ceci implique qu'elles exigent un motif tétrapeptidique de reconnaissance (P4-P3-P2-P1[↓]-X) sur leurs substrats⁹⁰. L'évaluation de l'effet de la nature des résidus acides aminés de chacune des positions (P2, P3 et P4) sur l'affinité de différentes caspases a permis de déterminer le degré de sélectivité et ressortir les variations de spécificité entre différents membres de cette famille de protéases^{109;109}. Cette évaluation a montré que l'exigence des caspases pour les positions P2 et P3 ne sont pas élevées mais la nature du résidu de la position P4 s'est montrée déterminante pour la spécificité pour un substrat donné ce qui a permis la classification des caspases en trois catégories selon leur spécificité. Les caspases du groupe-I (caspases-1, 4, 5, et 13) préfèrent des substrats dont la position P4 est un résidu hydrophobe (exemple YVAD) mais tolèrent certaines substitutions expliquant le rôle marginal de ce groupe dans l'apoptose. Les caspases du groupe II (caspases-2, 3 et 7) constituent un groupe très sélectif car elles exigent un résidu Asp au P4. Ce motif en DXXD (exemple DEVD) se trouve, d'ailleurs, dans une grande majorité des substrats clivés lors de l'apoptose faisant du groupe II le pouvoir exécutif de l'apoptose. Le groupe III (caspases-8, 9 et 10) préfère des résidus à chaînes aliphatiques en P4 (exemple IETD) ce qui convient à des caspases initiatrices qui servent à activer les autres caspases car ce genre de motif est rencontré sur les

caspases du groupe II. Les activités catalytiques des caspases sont non seulement très sélectives mais elles sont aussi très efficaces pouvant atteindre des constantes catalytiques K_{cat}/K_M supérieur à $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$. Cette sélectivité va de pair avec le profil bien déterminé, sélectif et reproductible de dégradations moléculaires et altérations structurales attribuées au stéréotype de l'apoptose.

1.2.2.d. Les substrats des caspases

Les substrats des caspases sont des protéines de natures et de fonctions variées qui portent un ou plusieurs motifs tétrapeptidiques de clivage par les caspases (tableau 1). C'est grâce à la découverte de ces substrats qu'on a pu élucider les mécanismes moléculaires des altérations structurales et morphologiques liées à l'apoptose. Ainsi la protéolyse des protéines structurales telles que les lamines (A, B et C), l'actine et la gelsoline mène au désassemblage du noyau et du cytosquelette^{13;110;111}. La dégradation des molécules du maintien et de réparation telles que RFC-140 (Replication Factor C-140), un facteur de réplication, ou PARP (Poly(ADP-ribose) polymerase), une enzyme requise à la réparation de l'ADN, provoque l'arrêt des fonctions vitales.^{112;113} La protéolyse sert aussi à l'inactivation des molécules du programme anti-apoptotique de la cellule telles que Bcl-2 et Bcl-xL. Par ailleurs, l'activité protéolytique des caspases peut aussi amplifier directement ou indirectement le processus de mort. C'est le cas du clivage de Bid, par caspase-8 qui induit sa translocation à la membrane mitochondriale et déclenche une série d'événements culminant en l'activation de caspase-9¹¹⁴. De même, le clivage de DFF-45/ICAD (DNA Fragmentation Factor/Inhibitor of Caspase-Activated DNase) permet la libération de DFF40/CAD (Caspase-Activated DNase), la DNase responsable de la fragmentation d'ADN observée lors de l'apoptose¹¹⁵.

1.2.2.e. Régulation des caspases

Le fait que les caspases aient des activités protéolytiques létales indique que ces protéases font l'objet d'un contrôle et d'une régulation étanche, surtout si on considère leur expression constitutive. L'ensemble des connaissances concernant les caspases indique que ces enzymes sont régulées à différents niveaux. En effet, les caspases sont exprimées sous forme inactive et leur activation est induite seulement en cas de stimuli apoptotiques bien définis tels que la ligation des DRs. Un autre point de contrôle basé sur la présence d'un tripeptide Asp-Asp-Asp sur caspase-3 a été proposé par l'équipe de Nicholson. Ce processus appelé "safety catch" semble contrôler l'activation de caspase-3 car la substitution du tripeptide par mutagenèse augmente

Substrat	Dégradé par	Effet de la dégradation
<u>Protéines de structure</u>		
Lamine A	Caspase-6	Décompose la matrice nucléaire
Lamine B	Caspase-6	Condense la chromatine
Lamine C	Caspase-6	Retreci le noyau
Focal adhesion kinase	Caspase-6,7	Altère l'adhésion focale
Gelsoline	Caspase-3	Décompose les filaments d'actine
Keratine 18	Caspase-3,6,7	Altère les filaments intermédiaires
Actine	Caspase-3	Décompose les filaments d'actine
NuMA	Caspase-3,4,6,7	Dissous la chromatine
<u>Protéines de signalisation</u>		
MEKK1	Caspase-3	Active les SAPKinases
STAT1		Inhibe la signalisation des interferons
PKC _δ	Caspase-3	Condense le noyau
PKC _θ	Caspase-3	Fragmente le noyau
Akt		Inhibe les voies de survie
NF-κB p56	Caspase-3	Inhibe l'induction des gènes de survie
NF-κB p50	Caspase-3	Inhibe l'induction des gènes de survie
<u>Régulateurs du cycle cellulaire</u>		
Mdm2	Caspase-3	Inhibe p53
PISTLRE kinase	Caspase-1 et 3	
Rb	Caspase-3	Libère E2F-1
Cdc27		
Wee-1		Active cdc2 et cdk2
<u>réparation de l'ADN</u>		
PARP		Inhibe la réparation de l'ADN
DNA-PK		Inhibe la réparation de l'ADN
<u>Inflammation</u>		
Interleukine-1	Caspase-1	Mature l'IL-1
Interleukine-16	Caspase-3	Mature de l'IL-16
Interleukine-18	Caspase-1	Mature de l'IL-18 et in de INF _γ

Tableau 1. Quelques substrats des caspases. Les substrats des caspases peuvent être subdivisés en groupes fonctionnels selon leur fonction physiologique et l'effet de leur dégradation sur ces fonctions ainsi que sur l'exécution de l'apoptose. A noter aussi l'existence de substrats dont la dégradation par les caspases est plutôt nécessaire à des fonctions biologiques non-apoptotiques telles que la maturation de certaines cytokines pro-inflammatoires. Tableau adapté de Rathmell J. C. et Thompson C. B⁷.

considérablement la capacité autocatalytique de caspase-3 et sa vulnérabilité au clivage par d'autres caspases¹¹⁶. Le troisième niveau réside dans la régulation de l'activité des caspases par une série de molécules d'origine endogène ou exogène dans le cas des infections virales.

FLIP (FLICE-Inhibitory protein): le criblage de banques de données a mené à l'identification d'une grande famille de protéines virales munies du motif DED.¹¹⁷⁻¹²⁰. Ces molécules ont été groupées sous le nom de vFLIP (viral FLICE Inhibitory Protein) grâce à leur homologie avec FLICE/caspase-8 et leur capacité de bloquer l'apoptose induite via TNFR-I, DR3 et DR4^{119;121}. Une séquence homologue de ce gène a été identifiée chez l'Homme par plusieurs groupes de recherches d'où la riche nomenclature: FLAME-1, I-FLICE, CASH, CASPER, CLARP, MRIT et Usurpin^{76;122-127}. Seul le nom cFLIP (cellular FLIP) a été retenu. C-FLIP compte de nombreux isoformes dont deux seulement sont détectés à l'état de protéine, une forme longue (cFLIP_L) et une courte (cFLIP_S)¹²⁸. Le rôle de cFLIP dans la protection contre l'apoptose induite par Fas est resté longuement controversé mais des études récentes basées sur des niveaux d'expression plus physiologiques ont confirmé la nature inhibitrice de cette molécule dans l'apoptose induite via Fas^{122;124;125;128}. Ces données ont été ultérieurement confirmées par la sensibilité élevée des cellules provenant des souris cFLIP^{-/-} à l'apoptose induite via les DRs¹²⁹. Le haut degré d'homologie de FLIP avec caspase-8 et caspase-10 et sa capacité d'interagir avec celles-ci dans le DISC a permis de conclure que cette molécule régule l'apoptose via les DRs en modulant le recrutement et/ou l'activation de ces deux caspases dans le DISC^{76;128;130}. De nombreuses études ont souligné l'augmentation de l'expression de c-FLIP dans les lymphocytes T activés via le TCR^{131;132} et ont corrélé cette induction avec la résistance de ces cellules à l'apoptose par AICD^{125;133}.

CrmA (Cytokine response modifier A): ce gène précoce du virus de cowpox est connu pour son effet anti-inflammatoire au niveau des sites de l'infection¹³⁴. Il appartient à la famille des inhibiteurs de protéases de type serpin (serine protease inhibitor) mais constitue une exception dans cette famille puisqu'il est le seul capable d'inhiber des caspases^{135;136}. CrmA peut lier et inhiber caspases-1 et 8 ce qui lui permet d'inhiber la production de IL-1 et IL-18 et l'induction de l'apoptose par Fas ou TNFR^{56;137;138}. Les constantes physico-chimiques d'inhibition de cet inhibiteur ainsi que l'étude des souris transgéniques surexprimant CrmA, indiquent qu'il ne peut inhiber caspase-3, 6, 7 et 9 mais les données concernant caspase-10 restent contradictoires¹³⁹⁻¹⁴³. Le mécanisme d'inhibition de CrmA est conventionnel à toutes les

serpins et consiste à lier des enzymes déjà actives à l'aide de son motif de clivage LVAD^{135;136}.

P35: est une protéine baculovirale capable de bloquer l'apoptose induite chez les insectes¹⁴⁴. En plus de son effet antagoniste sur plusieurs caspases des insectes et ced-3 cette protéine est aussi capable d'inhiber caspases-1, 3, 6, 7, 8 et 10 chez l'Homme¹⁴⁵. La surexpression de p35 inhibe la mort programmée liée au développement de *C. elegans* et plusieurs stimuli induisant l'apoptose chez les thymocytes¹⁴⁶.

La famille des IAPs (Inhibitors of Apoptosis): le premier membre de cette famille d'inhibiteurs a été isolé à partir du génome du baculovirus^{147;148} alors que plusieurs autres homologues cellulaires ont été détectés chez divers organismes incluant l'Homme¹⁴⁹⁻¹⁵². On compte huit IAPs humains dont cIAP-1 et cIAP-2, les premiers isolés à partir du complexe de signalisation de TNFR-II, XIAP, ML-IAP, NIAP, Survivin et APOLLON^{149;153} (figure 4). XIAP, cIAP-1 et cIAP-2 sont capables d'inhiber l'apoptose induite par TNF α ^{154;155}. La structure des IAPs est caractérisée par la présence de trois motifs. Un motif RING finger C-terminal et un motif BIR (Baculovirus IAP Repeat) N-terminal représenté une à trois fois (BIR1-3) et nécessaire à l'interaction avec les caspases et leur inhibition¹⁵⁶⁻¹⁵⁹. Le troisième motif, CARD, est exclusif aux membres cIAP-1 et c-IAP-2. CIAP-1, cIAP-2 et XIAP inhibent caspases-3, 7 et 9^{160;161}. L'analyse de structure-fonction indique que l'inhibition de caspase-9 par XIAP est basée sur l'interaction du domaine BIR3 avec quatre résidus acides aminés de la petite sous-unité de cette caspase, alors que l'inhibition de caspases-3 et 7 est plutôt basée sur le domaine BIR-2¹⁶²⁻¹⁶⁶. Certains membres de cette famille d'inhibiteurs semblent jouer un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, comme c'est le cas de survivin, ou dans la dégradation par le protéasome de certaines protéines incluant les caspases¹⁶⁷. Ceci suggère que ces inhibiteurs peuvent interférer avec l'apoptose non seulement en bloquant l'activité protéolytique des caspases mais aussi en participant à la dégradation de celles-ci. Il faut toutefois mentionner que les souris XIAP^{-/-} ne présentent pas un phénotype reflétant un excès d'apoptose^{168;169}. Comme dans le cas de cFLIP, l'expression constitutive de cIAP-2 ainsi que l'induction de XIAP et de survivin dans les cellules T activées a été associée avec la protection de ces cellules contre l'apoptose par AICD ou via les DRs¹⁷⁰⁻¹⁷².

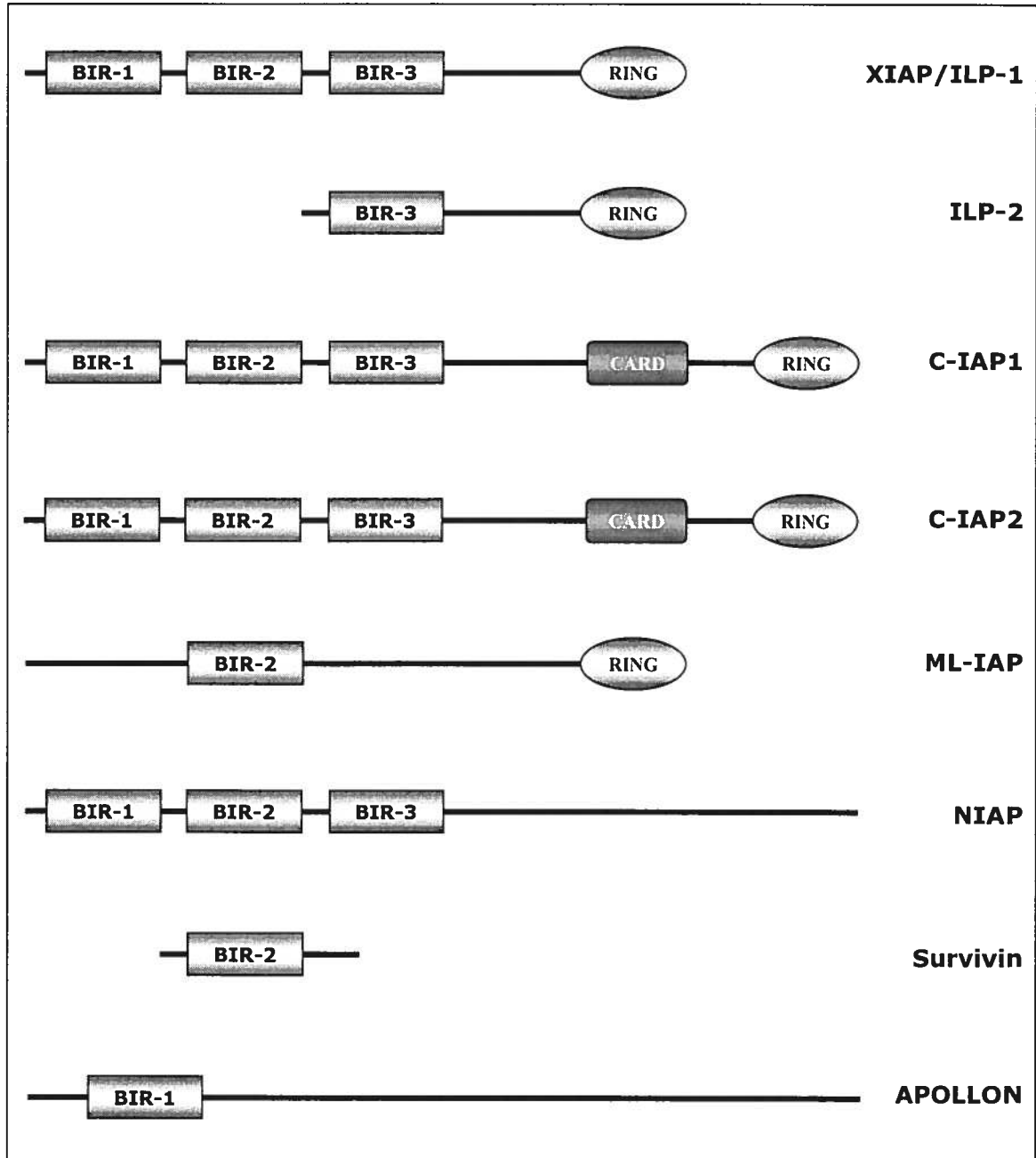


Figure 4. Représentation schématique des membres de la famille des IAPs. Les membres de cette famille se distinguent par la présence, dans la région N-terminale, d'une série d'une à trois copies d'un motif BIR (Baculovirus IAP repeat) essentiel à l'activité anti-apoptotique de cette famille d'inhibiteurs. Certains membres présentent un motif RING dans leur région C-terminale. Deux de ces membres présentent un motif CARD similaire à celui des caspases. Schéma adapté de Salvesen G.S. et Duckett C. *S*^{149;153}.

SMAC (Second Mitochondrial activator of apoptosis)/DIABLO (Direct Iap Binding protein with Low pI): la mitochondrie participe au processus de l'apoptose non seulement en activant caspase-9 à l'aide de la libération du cytochrome c mais aussi en levant l'inhibition des caspases par les IAPs en libérant un autre facteur mitochondrial: SMAC chez l'Homme ou DIABLO chez la souris^{173;174}. Ce facteur est libéré dans le cytoplasme simultanément avec le cytochrome c durant l'apoptose suite à la protéolyse de la séquence nécessaire à son ciblage à la mitochondrie. Cette molécule se lie et séquestre XIAP et probablement d'autres IAPs menant ainsi au regain de l'activité des caspases. L'analyse structurale a révélé la présence, sur SMAC/DIABLO, de quatre résidus acides aminés IBM (IAPs-Binding Motif) identiques à ceux utilisés par caspase-9 pour interagir avec XIAP¹⁶². Ceci suggère que c'est la compétition entre SMAC/DIABLO et caspase-9 pour l'interaction avec XIAP qui est à l'origine de la levée d'inhibition. De nombreuses études ont souligné la contribution de cette molécule à l'apoptose induite via les DRs^{175;176}. Or, le fait que l'isoforme SMAC β puisse promouvoir l'apoptose, alors qu'il est dépourvu du motif IBM, suggère que l'activité de cette molécule n'est pas toujours liée à sa capacité de neutraliser XIAP^{141;177}. De même, les cellules provenant des souris SMAC/DIABLO^{-/-} répondent normalement à l'apoptose induite par plusieurs stimuli apoptotiques y compris la ligation de Fas¹⁷⁸. Ces données sèment le doute sur la réelle contribution de SMAC/DIABLO à l'induction de l'apoptose via les DRs. Cependant, il faut rappeler que cette molécule compte un homologue, Omi/HtrA2, capable de compenser sa déficience et masquer son apport à cette forme d'apoptose^{179;180}.

La famille de Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2): Bcl-2 connu d'abord comme proto-oncogène¹⁸¹⁻¹⁸³, compte au moins 20 molécules apparentées présentant toutes une à quatre copies d'un motif conservé BH (Bcl-2 Homology domain) et sont groupées en deux classes (figure 5): une classe des inhibiteurs de l'apoptose incluant Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1, Mcl-1 et Boo et une autre classe des membres pro-apoptotiques comprenant, entre-autres Bax, Bak, Bik, Bim, Bad et Bid^{184;185}. Certains membres comme Bim, Bad et Bid sont dotés d'un seul domaine BH3 formant ainsi la sous-classe "BH3-only". Bcl-2 est capable de contrer divers stimuli apoptotiques incluant la privation de facteurs de croissance tels que l'IL-3 et la réticulation de Fas¹⁸⁶. Selon les analyses de structure, Bcl-xL est similaire à certaines toxines bactériennes, comme la toxine de diphteria (DT) capables de former des pores dans les membranes¹⁸⁷ mais l'impact de cette activité sur l'apoptose n'est pas encore clair. L'interaction de Bcl-2 avec son antagoniste Bax¹⁸⁸ suggérait que l'effet anti-apoptotique de Bcl-2 réside dans sa capacité de séquestrer celui-ci et vice versa mais il

s'est avéré plus tard que ces molécules peuvent induire l'apoptose ou l'inhiber indépendamment de leurs interactions. La plupart des membres de la famille Bcl-2 est associé aux membranes externes de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique et du noyau à l'exception de certains membres pro-apoptotiques comme Bid, dont la translocation à la mitochondrie est induite suite à son clivage par caspase-8 en réponse à la ligation des DRs^{114;189}. Cette localisation mitochondriale de Bcl-2 et ses homologues anti-apoptotiques a permis de conclure que Bcl-2 inhibe l'apoptose en prévenant la fuite, depuis la mitochondrie, de facteurs apoptogéniques comme le cytochrome c, SMAC/DIABLO, AIF (Apoptosis-Inducing factor) et la DNase Endo G¹⁸⁵. Comme dans le cas de FLIP et les IAPs, l'induction de Bcl-2 et Bcl-xL suite à la réticulation du TCR est associée aussi avec la protection des cellules T contre l'apoptose induite par Fas^{62;132;190}.

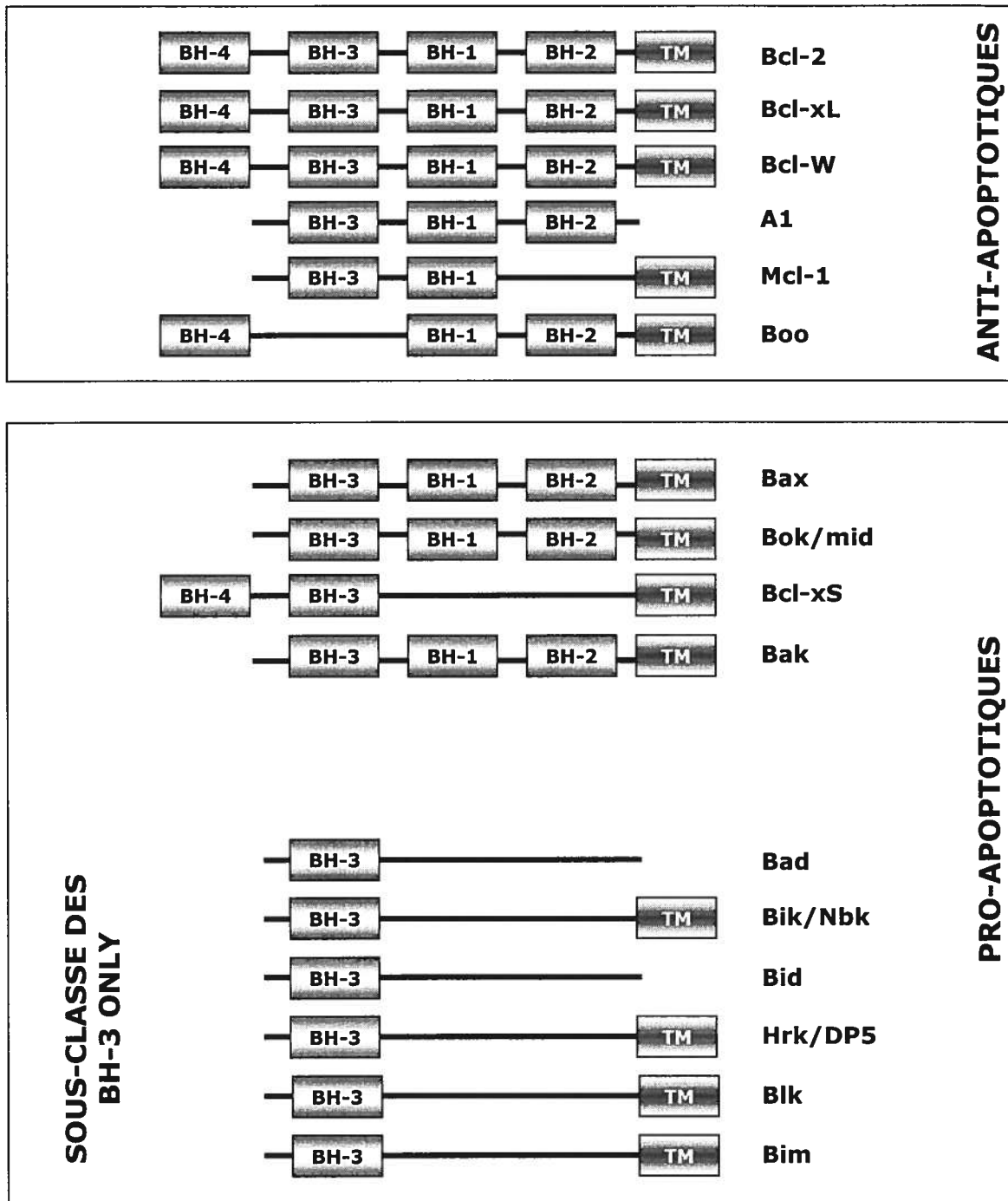


Figure 5. Représentation schématique des membres de la famille de Bcl-2. Les membres de cette famille sont dotés d'une à quatre copies d'un motif N-terminal distinctif BH (Bcl-2 Homology Domain). A l'exception de certains membres, ces molécules présentent toutes dans leur région C-terminale un motif TM nécessaire à leur ancrage dans les membranes intracellulaires (mitochondrie, RE et noyau). Selon leur impact sur l'exécution de l'apoptose, ces membres ont été divisés en deux groupes. Un groupe de membres anti-apoptotiques incluant Bcl-2 et Bcl-xL et un groupe pro-apoptotique. Certains membres de ce deuxième groupe ne présentent qu'une seule copie du motif BH3 d'où l'appellation BH3-only de ce sous-groupe. Schéma adapté de Strasser A^{184;185}.

2. La voie des granules cytotoxiques et les granzymes ou voie d'exocytose

C'est en 1985 que la voie d'exocytose a été proposée pour la première fois comme moyen d'élimination des cellules cibles (infectées ou cancéreuses) par les lymphocytes T¹⁹¹. Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et les natural killers (NK) sont dotées de granules cytolytiques qui contiennent une panoplie de protéines dont la combinaison est létale pour la cellule cible^{192;193}. Parmi ces molécules on trouve perforine et certaines sérine protéases appelée granzymes dont l'expression est strictement restreinte aux lymphocytes et les NK^{194;195}.

2.1. Contenu et fonction des granules

2.1.1. Perforine (Pore-Forming protein ou PFP) est une protéine capable de former des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles. La PFP est une protéine similaire à l'élément C9 du complément¹⁹⁶. Elle est synthétisée sous forme de précurseur inactif dont l'activation nécessite un clivage qui lui confère la capacité de lier les membranes et initier la formation des pores d'une façon calcium-dépendante¹⁹⁷. La nécessité de cette protéine à la voie d'exocytose a été mise en évidence par l'incapacité des CTL et NK issus des souris PFP^{-/-} d'induire l'apoptose des cellules cibles et résoudre certaines infections virales^{193;198;199}.

2.1.2. Granulysine est un membre de la famille saponine des protéines associées aux lipides apparentées aux peptides anti-bactériens comme les défensines et les maganines²⁰⁰. Elle est active contre un large spectre de microbes incluant les bactéries Gram + et Gram -, les champignons et autres parasites. La granulysine recombinante est capable d'induire l'apoptose dans les cellules cibles en détruisant les membranes, la mitochondrie, et en activant caspase-9²⁰¹.

2.1.3. Calreticuline est une protéine de stockage de calcium qui interagit avec la PFP via son domaine P. Sa fonction chaperonne pourrait être à la base de la protection des lymphocytes contre l'activité létale de PFP²⁰².

2.1.4. Les protéoglycans tels que le serglycine (SG) sont des complexes macromoléculaires résistants aux protéases qui seraient impliquées dans l'assemblage et l'assimilation de PFP et les granzymes par les cellules cibles^{203;204}.

2.1.5. Rab-27 est une molécule impliquée dans la sécrétion et l'exocytose des granules. Elle a été associée récemment avec le syndrome de Griscelli²⁰⁵. L'activité cytotoxique des CTL et les NK est considérablement atténuée chez les souris Ashen

présentant une mutation de Rab27a et qui développent aussi le syndrome de Griscelli^{206;207}.

2.1.6. Cytokines et chemokines: les granules cytotoxiques contiennent aussi des cytokines comme Fas L, MIP-1 α , MIP-1 β et les RANTES²⁰⁸.

2.1.7. Les granzymes (granule-associated enzymes) sont des sérine-protéases appartenant à la superfamille de chymotrypsine²⁰⁹⁻²¹¹. L'expression de ces protéases est limitée aux lymphocytes et les NK. Une douzaine de membres de cette famille d'enzymes a été identifiés chez l'homme, la souris et le rat (granzyme A: GrA, B, C, D, E, F, G, H, J, K et M). Seuls les membres GrA, B, H, K et M sont représentés chez l'homme.

2.1.7.a. Structure des granzymes

Toutes les granzymes sont synthétisées sous forme de pré-proenzyme formé d'une séquence signal requise à leur ciblage au réticulum endoplasmique et l'appareil de golgi, un propeptide et un domaine catalytique^{194;195}. GrA et GrB subissent deux transformations protéolytiques au cours de leur maturation. Une première transformation qui libère le peptide signal puis une deuxième, effectuée par cathepsin C ou DPPI (Dipeptidyl Peptidase I), sert à libérer le prodomain et activer l'enzyme latente²¹²⁻²¹⁴. D'ailleurs, les CTLs provenant des souris DPPI^{-/-} sont, comme ceux des souris GrAxGrB^{-/-}, incapables d'induire l'apoptose dans les cellules cibles à cause du défaut de maturation de ces deux protéases²¹⁵. La structure cristalline de GrB a révélé une similitude des granzymes avec la chymotrypsin²¹⁶. La structure cristalline de GrA n'a pas été effectuée mais cette enzyme semble exister sous forme de dimère stabilisé par des ponts disulfure²⁰⁴.

2.1.7.b. Effets biologiques

Parmi toutes les Granzymes connues, GrB semble être le principal déclencheur des altérations nucléaires induites chez les cellules cibles par les CTLs. D'ailleurs, les CTL des souris GrB^{-/-} perdent leur capacité d'induire la fragmentation rapide de l'ADN, une anomalie qui n'a pas été observée chez les CTL des souris GrA^{-/-}^{217;218}. Bien qu'elle soit classifiée parmi les sérine-protéases, GrB se comporte comme une caspase car elle possède une activité protéolytique du type aspartase²¹⁹. En effet, cette sérine-protéase clive ses substrats après un résidu Asp en P1, à l'instar des caspases, et ne se distingue de ces dernières que par la nature des résidus utilisés en P2, P3, et P4²²⁰. La capacité de GrB de cliver après les résidus aspartate lui confère la possibilité de

cliver et activer les caspases^{103;221;222}. Ceci a conduit à l'idée que GrB induit l'apoptose des cellules cibles seulement via l'activation de ces protéases²²³. Cependant, cette enzyme peut aussi dégrader directement certains substrats de mort tels que la filamine, NuMA et DNA-PK, quoique à des sites de clivage légèrement différents de ceux des caspases, ce qui indique qu'elle peut induire l'apoptose indépendamment des caspases^{105;224}. En effet, des travaux publiés par notre équipe ainsi que d'autres ont montré que GrB peut cliver DFF/ICAD directement et mener à la dégradation de l'ADN en absence d'une activité caspase^{225;226}. Bid est un autre substrat des caspases que GrB peut cliver directement sans la participation des caspases^{227;228}. Ce clivage semble assurer la connexion avec la mitochondrie. D'ailleurs, de nombreuses études ont souligné l'effet inhibiteur de l'expression de Bcl-2 sur l'apoptose induite par GrB confirmant la nécessité des événements mitochondriaux à l'exécution de cette forme de mort²²⁹. Des données récentes ont permis à l'équipe de Bleackley de déduire que l'apport de la mitochondrie dans la voie d'exocytose réside dans la libération de SMAC/DIABLO et la neutralisation, par ce dernier, de l'inhibition de caspase-3²³⁰. Si la libération de ce facteur mitochondrial est réellement le seul mécanisme à travers lequel la mitochondrie contribue à l'apoptose par GrB alors il faudrait que cette libération ne soit pas gouvernée par Bid, Bax ou Bak puisque les cellules issues des souris Bid^{-/-} et Bax/Bak^{-/-} demeurent sensibles à l'apoptose induite par GrB²³¹.

Granzyme A est la première activité sérine-protéase identifiée dans les granules cytolytiques²³². C'est une tryptase qui préfère des résidus Arg ou Lys en position P1 du substrat²¹⁹. Les substrats de GrA sont la nucléoline, le récepteur de thrombine sur les neurones, l'IL-1, PHAP-II, une protéine ubiquitaire associée au complexe majeur d'histocompatibilité, et les lamines²³³⁻²³⁷. Cependant, on ne connaît pas l'impact de la dégradation de ces molécules sur l'induction de l'apoptose. GrA ne semble pas cliver les caspases ni les autres substrats de GrB^{238;239}. Bien que plusieurs expériences aient montré sa capacité d'induire l'apoptose en combinaison avec la PFP, GrA semble être moins efficace que GrB dans ce processus^{240;241}. Récemment le groupe de Lieberman a montré que GrA cause une fragmentation d'ADN, plutôt simple brin, probablement grâce à sa capacité de dégrader l'histone H1 rendant ainsi l'ADN accessible aux endonucléases²³⁹.

La fonction biologique des granzymes autres que GrA et GrB est encore inconnue. A l'exception de GrH humaine, GrK, GrM dont les activités enzymatiques sont respectivement du type chymase, tryptase et métase^{211;242}, la spécificité des autres membres reste indéfinie et leur contribution à l'apoptose de la voie des granules est inconnue.

2.1.7.c. Régulation des granzymes

Les travaux de l'équipe de Bird ont révélé l'expression d'un inhibiteur de GrB appelé PI9 (Proteinase Inhibitor 9) dans les lymphocytes et les NKs suggérant l'existence d'un mécanisme de protection de ces cellules contre leur propre arsenal cytotoxique²⁴³⁻²⁴⁶. La surexpression de cet inhibiteur dans certaines cellules cibles inhibe l'apoptose induite par GrB²⁴³⁻²⁴⁶. SPI6 (Serine-Proteinase Inhibitor 6) est un autre inhibiteur de GrB appartenant à la famille des inhibiteurs de sérine protéases²⁴⁴. L4-100K est une molécule d'origine adénovirale qui agit aussi comme substrat suicide très spécifique de GrB et semble être un inhibiteur puissant de celle-ci²⁴⁷. Par ailleurs, on connaît deux molécules capables de former des complexes avec GrA, antithrombine III et α -2 macroglobuline mais on ne connaît pas encore l'effet de cette interaction sur l'activité de GrB²⁴⁸.

2.2 Mécanismes d'induction de l'apoptose par la voie d'exocytose

La reconnaissance d'une cellule cible infectée ou cancéreuse par des lymphocytes T active ces derniers et induit l'expression et l'assemblage dans les granules d'une série de protéines pro-apoptotiques incluant celles citées ci-dessus². Ces granules entament une migration polarisée jusqu'à la jonction de contact avec la cellule cible où elles déversent leur contenu toxique (figure 6). Au début de la caractérisation de cette voie de mort on pensait que les granzymes accèdent aux cellules cibles à travers les pores formés par PFP dans la membrane plasmique. Cependant, l'accumulation de GrB dans le cytoplasme de ces cellules en absence de PFP suggérait l'existence d'un mécanisme d'accès indépendant²¹⁸. Récemment, certaines études ont conduit à l'identification de deux mécanismes possibles d'accès des granzymes aux cellules cibles(figure 6)²⁴⁹. Le premier, identifié par l'équipe de Bleackley, propose l'utilisation par GrB d'un récepteur, CI-MPR (Cation-Independent Mannose Phosphate Receptor) pour accéder aux cellules cibles²⁵⁰. Le deuxième mécanisme propose l'accès des GrB aux cellules cibles sous forme de complexe macromoléculaire contenant PFP, GrB et le serglycine ²⁵¹.

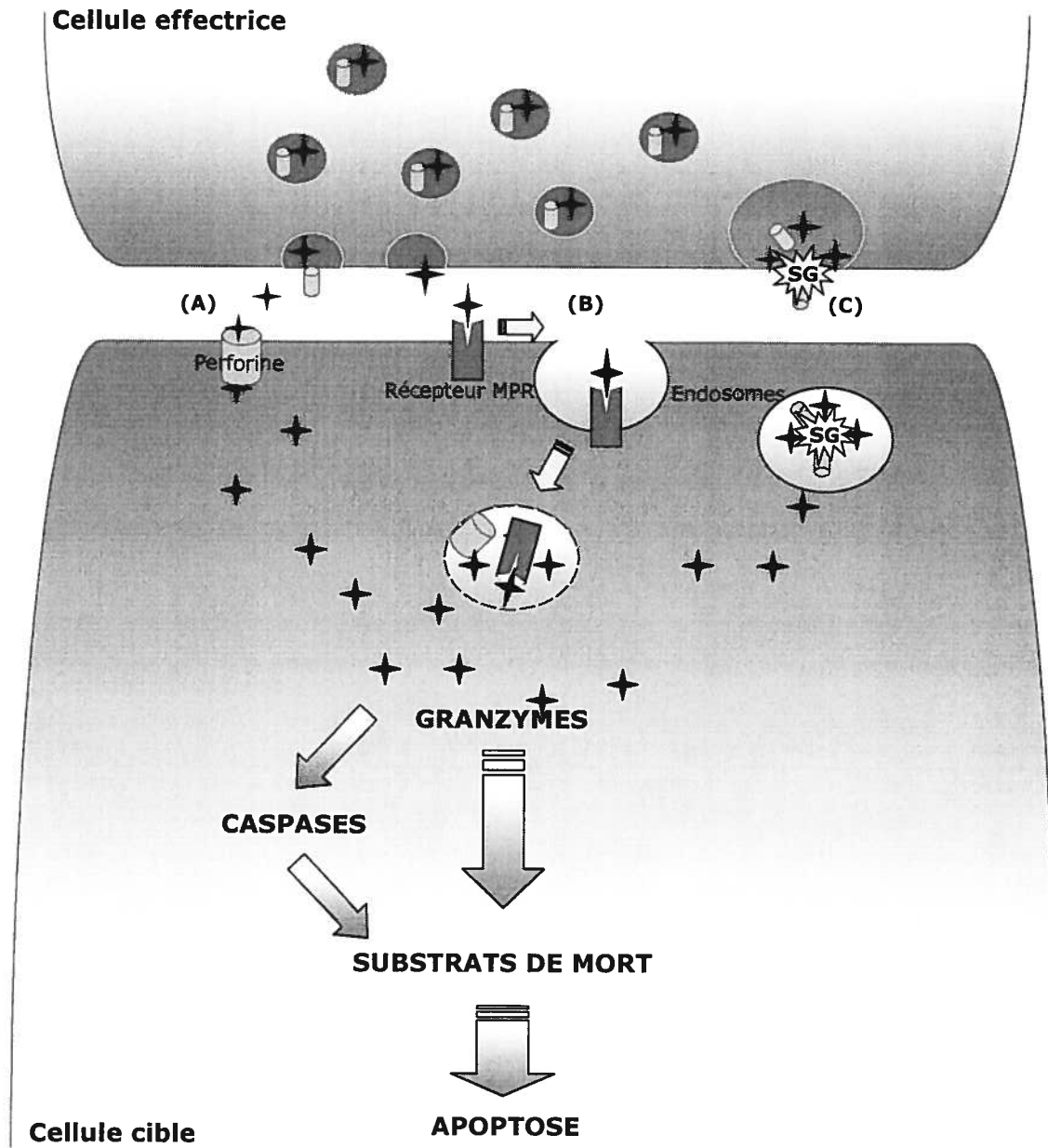


Figure 6. La voie d'exocytose: Les différents modèles d'accès des GrB aux cellules cibles. (A) On pensait que GrB et les autres composantes cytotolytiques des granules accédaient aux cellules cibles à travers les pores provoqués dans la membrane plasmique par PFP. Les études récentes proposent deux modèles plus complexes d'accès. **(B)** Le premier modèle suggère l'entrée de GrB dans les cellules par endocytose à l'aide du récepteur MPR exprimé à la surface de ces cellules. Dans ce modèle, PFP interviendrait seulement pour libérer GrB des endosomes vers le cytoplasme de la cellule cible. **(C)** Le deuxième modèle suggère que GrB forme des complexes macromoléculaires avec PFP et serglycin (SG) pour accéder aux cellules cibles par endocytose. Schéma adapté de Trapani J.A. et Smyth M.^{J249}.

IV- Implication physiologique et pathologique de l'apoptose dans la réponse immune

1. Rôles physiologiques de l'apoptose dans la réponse immune

1.1 Rôle de l'apoptose dans l'exécution de la réponse immune

L'apoptose joue un rôle capital dans le processus de la réponse immune à médiation cellulaire. Elle représente l'unique moyen d'exécution des cellules cibles, infectées ou tumorales, par les lymphocytes T et ce, via deux voies de mort, les TNFRs/DRs et les granules cytotoxiques^{3;4}.

1.1.a. L'apoptose comme mécanisme de surveillance anti-virale

La participation des TNFRs à la surveillance anti-virale se manifeste dans la capacité de TNF β à inhiber l'effet cytopathique du cytomegalovirus humain (HCMV) et sa propagation dans certaines cultures cellulaires. Ceci est confirmé par la grande sensibilité des souris déficientes en TNF β au cytomégalovirus^{252;253}. La voie des granules cytotoxiques participe aussi au contrôle d'une série de virus de divers tropismes tissulaires. Ceci se manifeste dans la grande susceptibilité des souris PFP^{-/-} et les souris GrAxGrB^{-/-} au virus murin du SIDA (MAIDS, murine AIDS), le virus de Theiler's, le CMV, le virus d'ectromélie ainsi que LCMV (Lymphocytic ChorioMeningitis Virus)²⁵⁴⁻²⁵⁹. Dans certains cas le système immunitaire semble solliciter les deux voies de mort simultanément. Ainsi dans le cas des infections au virus de l'hépatite ou le CMV murin, la simple déficience de l'organisme hôte en Fas ou bien en PFP ne semble pas affecter le contrôle du virus alors qu'en cas d'une double déficience des deux gènes, l'infection devient incontrôlable²⁶⁰⁻²⁶².

1.1.b. L'apoptose comme mécanisme de surveillance anti-tumorale

Les lymphocytes T CD8 et CD4 activés et les NK expriment de hauts niveaux de TRAIL et de Fas L et semblent utiliser ces derniers lors de la cytotoxicité contre les tumeurs^{48;263-268}. L'étude des souris déficientes en TRAIL a souligné l'implication active de ces DRs dans la surveillance antitumorale¹⁷⁴. TNF α est aussi impliqué dans la réponse anti-tumorale puisque l'administration d'un agent neutralisant de ce dernier dans un cadre thérapeutique contre l'arthrite rhumatoïde (RA) entraîne l'apparition de carcinomes squameux chez certains patients²⁶⁹.

Certaines études ont montré le rôle de PFP dans le contrôle des hyperplasies des lymphocytes B démontrant la participation de la voie d'exocytose à la réponse anti-tumorale²⁷⁰. Ceci est confirmé par le développement spontané des lymphomes chez les souris PFP^{-/-}²⁷¹. De même, PFP semble être dotée aussi d'une activité anti-

métastatique et ce, contre une panoplie de tumeurs non-lymphotoïdes incluant les sarcomes, les mélanomes et les carcinomes de sein ou de prostate^{272;273}.

1.2. Rôle de l'apoptose dans le contrôle et le désamorçage de la réponse immune

L'apoptose survient dans le système immunitaire pour contrôler deux paramètres distincts mais complémentaires de la réponse immune, la réactivité des lymphocytes T et leur nombre. Ce contrôle commence déjà lors du développement des lymphocytes alors que ceux-ci ne sont pas encore exposés aux antigènes étrangers. Ainsi les lymphocytes T immatures (thymocytes) auto-réactifs, qui reconnaissent et risquent de répondre aux antigènes du soi, sont éliminés par sélection négative. Cette forme d'apoptose est exécutée par le membre CD30 des TNFRs et nécessite les caspases^{274;275}. Au terme de leur développement, les lymphocytes T matures quittent le thymus et intègrent la périphérie (circulation sanguine et lymphatique) où ils participent aux réactions immunitaires contre les cellules infectées ou tumorales. Une fois la menace d'infection écartée l'apoptose intervient une fois de plus pour arrêter la réaction immunitaire et ce, en éliminant la majorité des cellules T qui y ont participé. Cette forme d'apoptose appelée AICD s'effectue par les lymphocytes T eux-mêmes de façon autocrine (suicide) ou paracrine (fratricide) et fait appel aussi aux deux voies de mort²⁷⁶.

La contribution majeure des DRs, particulièrement Fas, à l'AICD se manifeste par l'accumulation exagérée des lymphocytes T et B activés chez les souris *lpr* (*lymphoprolifération*) et *gld* (*generalized lymphoproliferative disorder*) qui présentent des mutations au niveau de Fas ou Fas L^{277;278}. TNFR participe aussi à l'AICD des lymphocytes T puisque l'apoptose résiduelle observée chez les souris *lpr* se trouve complètement abrogée suite au blocage ou la délétion de TNFR²⁷⁹. L'implication de la voie des granules dans cette forme d'apoptose a été révélée plus tard quand on a réalisé la nécessité de PFP à l'élimination des lymphocytes T CD8 après l'exposition de celles-ci à un antigène²⁸⁰⁻²⁸². D'ailleurs, les souris PFP^{-/-} présentent une accumulation anormale de lymphocytes T CD8 activés suite à l'infection par le virus LCMV^{281;283}.

2. Pathologies liées à l'apoptose dans la réponse immune

2.1. Pathologies liées à un défaut dans l'exécution de la réponse immune

2.1.a. Les maladies infectieuses

Altération de la surveillance anti-virale

Les virus possèdent des stratégies pour déjouer le système immunitaire et empruntent souvent les mécanismes moléculaires destinés à leur élimination pour fuir la réponse immune. Les poxvirus, léprivirus et les myxiomavirus induisent la cellule hôte à produire des formes solubles de certains TNFR ou sécréter des protéines capables de séquestrer et neutraliser l'effet des ligands TNF dressés par les CTLs²⁸⁴⁻²⁸⁶. De même certains adénovirus réussissent à éradiquer les récepteurs Fas, DR4 et DR5 de la surface des cellules hôtes afin de désensibiliser celles-ci aux attaques des CTLs et les NK²⁸⁷⁻²⁸⁹. La même situation a été observée avec la protéine Nef du VIH-1 qui interfère avec l'expression, à la surface cellulaire, de CD4 et du complexe majeur d'histocompatibilité I (CMH-I), deux molécules nécessaires à la reconnaissance des cellules cibles par les lymphocytes²⁹⁰. Dans d'autres cas, les virus comme le HSV, le HCMV, les rhéovirus ou bien le VIH semblent utiliser la tactique de l'attaque pour se défendre et ce, en induisant à la surface des cellules hôtes certains ligands tels que TNF, Fas L et TRAIL capables d'induire l'apoptose des lymphocytes T infiltrant le site d'infection²⁹¹⁻²⁹⁵.

Dans leur stratégie d'évasion à la réponse immune, les virus peuvent interférer aussi avec la signalisation intracellulaire de l'apoptose. En effet, le génome de nombreux virus code pour une panoplie d'inhibiteurs de caspases tel que E1B-19K chez l'adénovirus et certains homologues viraux de Bcl-2, tels que BHRF, BALF-1, KSBcl-2 et MHVBcl-2 chez le virus Epstein-Barr (EBV), le γ -herpesvirus humain et le KSHV, associé au sarcome de Kaposi,²⁹⁶⁻²⁹⁸. De même, Le poxvirus, le γ -herpesvirus et le CMV expriment d'autres inhibiteurs de caspases tels que CrmA, vFLIP et certains homologues des IAPs^{56;118;299-302}. Les virus peuvent aussi augmenter le niveau d'expression d'inhibiteurs endogènes comme c'est le cas du virus humain de leucémie des lymphocytes T (HTLV-1) qui induit l'expression de Bcl-xL via NF- κ B³⁰³.

En ce qui concerne la voie d'exocytose, le virus para-influenza type 3 est capable d'affaiblir l'activité cytolytique des CTLs en réduisant les niveaux d'expression de GrB³⁰⁴ alors que l'adénovirus produit une protéine, L4-100K, impliquée dans l'assemblage du virus qui semble inhiber l'activité protéolytique de GrB²⁴⁷.

Immunodéficiences: Le syndrome d'immunodéficiences acquises (SIDA)

Il existe des cas d'infections extrêmes où les virus provoquent l'arrêt quasi total de la surveillance anti-virale pour s'établir dans l'organisme hôte. C'est le cas du VIH

qui semble mobiliser les DRs et les caspases pour éliminer les lymphocytes CD4 d'une part et bloquer la voie d'exocytose pour atténuer l'activité cytolytique des CTLs d'une autre part. En effet, la perte massive des CD4 qu'accusent les individus infectés a été attribuée à l'induction exagérée de Fas L, TRAIL et TNF α ainsi que leurs récepteurs³⁰⁵⁻³⁰⁷. Cette perte corrèle aussi parfaitement avec la capacité de la protéase virale d'activer directement les caspases et induire l'apoptose³⁰⁸. De même, l'absence d'une activité cytolytique contre ce virus corrèle avec la capacité de celui-ci d'inhiber l'activation des CTLs et de réduire les niveaux d'expression de PFP dans ces cellules³⁰⁹, d'où l'immunodéficience sévère qui compromet la vie des patients atteints du SIDA.

2.1.b. Le cancer: Altération de la surveillance anti-tumorale

Le cancer a été considéré pendant longtemps comme une pathologie qui résulte de l'excès de prolifération des cellules dû à une division cellulaire incontrôlée. Or, la découverte du caractère anti-apoptotique du proto-oncogène Bcl-2^{181;183;310} a permis de réaliser que le processus de carcinogenèse résulte aussi d'un défaut de l'apoptose.

La répression de l'expression issue des mutations et des pertes alléliques des gènes de la famille TNFR survient fréquemment dans certains cancers. Ainsi l'expression de Fas, de DR4 et de DR5 est souvent atténuée ou réprimée dans les mélanomes, le cancer de seins, les lymphomes non-Hodgkiniens et ceux du cou et du cerveau³¹¹⁻³¹⁵. Cette corrélation entre l'altération de l'expression des DRs et le cancer a été confirmée par le développement spontané de tumeurs chez les souris TRAIL^{-/-}³¹⁶. Les tumeurs échappent aussi à la surveillance immune en exprimant les decoy receptors (DcRs), tels que DcR3^{40;317}. Elles peuvent aussi induire l'expression des ligands tels que Fas L, pour chasser les TILs (Tumor-Infiltrating Lymphocytes)³¹⁸. Par ailleurs les tumeurs peuvent déjouer la voie de l'exocytose en interférant avec l'accès du contenu des granules soit en devenant imperméables à PFP, comme c'est le cas des leucémies myéloïdes aiguës (AML, acute myeloid leukemia) ou en réprimant l'expression du récepteur MPR, nécessaire à l'entrée de GrB^{250;319}.

La répression touche aussi les éléments de signalisation intracellulaire des voies de mort comme c'est le cas pour caspase-3, dans le carcinome de sein (lignée MCF-7) ou caspase-8 dans plusieurs types de cancers incluant les neuroblastomes, les tumeurs d'Edwing et les mélanomes³²⁰⁻³²³. L'inactivation caspase-10 est une autre transformation qui semble contribuer au développement des lymphomes non-hodgkiniens (NHL) et le cancer gastrique^{324;325}.

Dans d'autres situations c'est l'augmentation de l'expression des inhibiteurs de la signalisation de mort, tels que FLIP, survivin, XIAP ou encore SPI6 et PI9, inhibiteurs spécifiques de GrB, qui contribue à la transformation des cellules³²⁶⁻³³¹. La contribution

de cette surexpression à la transformation a été validée, dans le cas de XIAP, par la sensibilisation de ces cellules à l'apoptose à l'aide de l'introduction d'un dominant négatif ou certains antagonistes cellulaires naturels³³⁰.

2.2. Pathologies liées à un défaut dans le contrôle de la réponse immune: auto-immunité ou révolte contre le soi

Les maladies auto-immunes sont des pathologies chroniques qui affectent une bonne partie de la population. Ces maladies résultent souvent d'une perte de la tolérance du système immunitaire au soi menant à une réaction généralisée contre l'organisme (auto-immunité systémique) ou ciblant un tissu spécifique (auto-immunité organe-spécifique). Ces pathologies sont multifactorielles et leurs étiologies restent complexe même si la contribution du système lymphatique est évidente. En effet, malgré l'association étroite avec le polymorphisme du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) indiquant une part de la prédisposition génétique et l'implication du système immunitaire, la contribution des facteurs environnementaux est non négligeable.

2.2.1. Auto-immunité systémique

2.2.1.a. Le syndrome d'auto-immunité lymphoproliférative (ALPS) Ce syndrome de lymphoprolifération a été découvert d'abord chez des souris portant des mutations inactivant Fas (*lpr*) ou Fas L (*gld*) puis chez l'homme au milieu des années 90. La majorité des patients ALPS (Autoimmune Lymphoproliferative Syndrom) homologues des souris *lpr* et *gld* souffrent de lymphoadénopathie, de splénomégalie, de surproduction d'auto-anticorps et de l'hypergammaglobinémie. Ceci démontre le rôle du système Fas/FasL non seulement dans le contrôle du nombre des lymphocytes (homéostasie) mais aussi dans le contrôle et l'élimination des lymphocytes auto-réactifs à l'origine des réactions autoimmunes³³²⁻³³⁵. D'ailleurs, ces patients développent divers symptômes d'auto-immunité incluant l'arthrite rhumatoïde, la glomerulonéphrite et le lupus érythémateux systémique (SLE)^{334;336}. Récemment, une troisième mutation inactivant le gène de caspase-10 a été découverte chez un groupe de patients ALPS-II de la même cohorte confirmant l'implication de Fas et des éléments de sa signalisation dans la prévention de l'auto-immunité³³⁷.

2.2.1.b. La lymphohistiocytose haemophagocytaire familiale (FHL) est une autre pathologie auto-immune infantile systémique rare et fatale. Les patients FHL présentent des symptômes similaires à ceux des souris PFP^{-/-} incluant la lymphoprolifération et l'infiltration excessive des lymphocytes T activés et les

macrophages dans plusieurs organes dont la moelle osseuse, la rate, le foie, les ganglions lymphatiques et le système nerveux central entraînant la fièvre, des troubles nerveux et de coagulation²⁴⁹. L'analyse génétique des patients FHL a mené à la découverte de mutations dans le gène PFP révélant l'implication active de la voie d'exocytose dans la prévention de l'auto-immunité^{280;338}.

2.2.2. Auto-immunité organe-spécifique

2.2.2.a. Le diabète ou IDDM (*Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*) est une maladie chronique caractérisée par la diminution du taux de l'insuline dans l'organisme due à la destruction des cellules β ³³⁹. Plusieurs données indiquent la contribution des lymphocytes CD4 et CD8 à la destruction de ces cellules et ce, à l'aide des deux voies de cytotoxicité^{340;341}.

2.2.2.b. La sclérose en plaque (MS, *Multiple Sclerosis*) résulte de la démyélinisation du système nerveux central qui entraîne la formation de lésions typiques appelées plaques associées à la perte de certaines fonctions nerveuses. Le modèle murin de cette maladie appelé encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE), induit par l'administration de la myéline aux souris, a contribué à la compréhension de cette maladie³⁴²⁻³⁴⁴. La contribution du système Fas/Fas L à cette maladie a été mis en évidence chez les souris *Lpr* et *gld* qui sont protégés de la démyélinisation expérimentale³⁴⁵⁻³⁴⁷. L'analyse histologique de cerveaux des patients MS a relevé une expression élevée de Fas sur les oligodendrocytes ainsi qu'une grande infiltration des tissus par des lymphocytes exprimant Fas L^{348;349}.

2.2.2.c. Le syndrome de Sjogren (SS) est caractérisé par la destruction des glandes salivaires et lacrymales et une infiltration massive de ces glandes par des cellules lymphoïdes mononucléaires. L'implication de Fas et Fas L dans cette pathologie a été déduite de la découverte chez les souris *lpr* d'une grande infiltration lymphoïde des glandes citées^{350;351}, mais les souris *scid* immunodéficientes dépourvues de lymphocytes développent toujours ce syndrome écartant la contribution de ce type de cellules à la destruction de ces tissus³⁵². Or, les cellules des glandes des patients SS montrent un niveau élevé d'expression de Fas et de son ligand suggérant la destruction fratricide de ces cellules par apoptose³⁵¹.

2.2.2.d. La thyroïdite d'hashimoto (HT) est caractérisée par la diminution du taux de l'hormone thyroïdienne TSH (Thyroid-Stimulating Hormone) dans l'organisme due à l'hypothyroïdie résultant de l'apoptose massive des cellules

épithéliales de la thyroïde³⁵³. La thyroïde de ces patients est infiltrée par un nombre élevé de lymphocytes T et B^{354;355}. Les thyrocytes normaux expriment peu ou pas de Fas et Fas L, mais les thyrocytes provenant des patients HT présentent une expression élevée de ces deux molécules pro-apoptotiques qui serait à l'origine de la destruction de ces cellules par apoptose autocrine ou paracrine³⁵⁶.

2.2.2.e. La polyarthrite rhumatoïde (RA) est caractérisée par le gonflement des articulations et résulte plutôt d'un défaut d'apoptose qui mène à la croissance hyperplasique incontrôlée des cellules synoviales qui envahissent et détruisent le cartilage et l'os^{357;358}. Plusieurs études suggèrent la contribution des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF α ainsi que la forme soluble de Fas à la prolifération de ce tissu et à sa résistance à l'apoptose via Fas³⁵⁹⁻³⁶¹. La voie d'exocytose semble aussi contribuer à cette maladie puisque les patients RA présentent des niveaux élevés de GrA et GrB solubles dans la circulation sanguine³⁶².

2.2.3. Autres facteurs contribuant aux maladies auto-immunes

Un trait caractéristique commun à plusieurs maladies auto-immunes et pro-inflammatoires est la surproduction des auto-anticorps dirigés contre des molécules intracellulaires (auto-antigènes) comme l'ADN et certaines protéines cytoplasmiques ou nucléaires normalement inaccessibles aux anticorps³⁶³. Cependant, lors du processus de l'apoptose, les produits de dégradation de ces molécules se trouvent exposés à la surface des corps apoptotiques. Dans les conditions d'auto-immunité, comme le lupus systémique érythémateux (SLE), la défectuosité de l'élimination des cellules mortes par phagocytose prolonge le temps d'exposition de ces auto-antigènes et entraîne une réponse humorale à l'origine du bris de la tolérance au soi et l'apparition de l'auto-immunité. D'ailleurs, de nombreux substrats de caspases tels que la fodrine, les lamines et l'actine ont été identifiés d'abord comme auto-antigènes associés à plusieurs maladies auto-immunes comme le syndrome de Sjogren, le SLE et l'hépatite auto-immune^{363;363-365}. Ces données indiquent la contribution de l'apoptose et plus particulièrement des caspases au bris de la tolérance et à l'étiologie de l'auto-immunité.

OBJECTIFS ET JUSTIFICATION DES TRAVAUX

Ayant associé l'activité protéolytique des caspases exclusivement à l'inactivation des molécules vitales et la dégradation des structures cellulaires, les recherches qui exploraient les mécanismes moléculaires de la réponse immune ont restreint le champ d'action de cette famille d'enzymes aux phases apoptotiques de cette réponse. Pourtant caspase-1, le premier membre de cette famille de protéases, a été reconnu à l'origine pour son implication dans l'inflammation^{85;86}, un processus immunitaire non-apoptotique. Une observation issue de nos travaux préliminaires ainsi que certains indices documentés dans la littérature nous ont induit à soupçonner l'implication de ces protéases dans un autre événement immunitaire non-apoptotique, l'activation des lymphocytes T. Tenant compte du rôle central que jouent les caspases dans l'apoptose de ces cellules, nous avons entrepris l'analyse du comportement de ces protéases et leur contribution à ces deux phases opposées de la réaction immunitaire, l'activation des lymphocytes T et leur apoptose par AICD.

I- Implication des caspases dans l'initiation de la réponse immune

La réponse immune est déclenchée suite à la reconnaissance d'un antigène par les lymphocytes T. Cet événement induit l'activation et la prolifération de ces cellules plutôt que leur apoptose. Cependant, certaines données biochimiques³⁶⁶, dont la notre, ont montré que la stimulation des cellules T via le TCR induit l'activation de caspase-3 processus qu'on croyait lié uniquement à l'apoptose. Bien que mal accueilli au début, cette observation trouve un appui dans certains indices moléculaires. En effet, les lymphocytes T provenant des souris déficientes en une molécule cruciale à l'activation des caspases, FADD, ou ceux provenant des souris surexprimant un dominant négatif de cette même molécule, présentent un défaut de prolifération irréversible^{367;368}. L'ensemble de ces observations nous a poussé à étendre l'analyse du profil d'activation à d'autres caspases ainsi que certains de leurs substrats et de déterminer si une telle activation contribue éventuellement à ce processus non-apoptotique de la réponse immune, l'activation des lymphocytes T. Les points que nous avons adressé lors de cette analyse sont exposés dans le premier chapitre et l'annexe qui lui est jointe sous la rubrique des résultats.

II-Implication des caspases dans le désamorçage de la réponse immune

Une fois la menace d'une infection écartée, la réponse immune entre dans une phase de désamorçage où la majorité des lymphocytes T, ayant servi à cette réponse, sont éliminés par AICD via la voie des DRs, comme Fas, ou celle des granules cytotoxiques⁴. Dans la voie de l'apoptose via Fas, caspase-8 demeure considérée comme la seule impliquée dans l'initiation de la cascade protéolytique des caspases,

étant donnée sa capacité d'interagir avec ce récepteur. Cependant dans les cellules du type-II, comme les lignées lymphocytaires T, CEM et Jurkat, le pouvoir d'initiation de cette caspase semble faible et requiert l'intervention des événements post-mitochondriaux pour son amplification⁶¹. Nos données préliminaires ont montré que l'activation de caspase-3 survient tôt suite à la ligation de Fas chez la lignée Jurkat. Cette précocité d'activation réunie avec l'incapacité de caspase-8 d'initier l'apoptose dans cette lignée nous a conduit à vérifier si caspase-3 participe aussi à l'initiation de la cascade protéolytique issue de la ligation de Fas. Les expériences qui ont servi à répondre à cette question sont présentées dans le deuxième chapitre sous la rubrique des résultats.

III-Génération d'une chimère TAT-granzyme B dotée d'une double capacité de transduction et d'induction d'apoptose

Lors de la phase d'exécution de la réponse immune, les cellules cibles infectées ou cancéreuses sont éliminées par les CTLs et les NKs à l'aide des deux voies majeures de mort⁴. Dans la voie d'exocytose, les CTL font appel à l'activité protéolytique de granzyme B (GrB) pour induire l'apoptose dans les cellules cibles. La reproduction expérimentale de ce processus physiologique de défense fait systématiquement appel à des molécules supplémentaires, telles que la perforine, pour faciliter l'accès de GrB aux cellules cibles. Cette approche est non seulement compliquée car elle nécessite plusieurs étapes de préparation mais elle empêche aussi l'appréciation du rôle exact de GrB et sa réelle contribution au processus de cytolysse des cellules cibles. Par ailleurs, cette sérine protéase est dotée d'un grand potentiel thérapeutique mais la nécessité des accessoires moléculaires cités ci-dessus pour livrer son activité létale aux cellules cibles empêche l'éventuel investissement d'un tel potentiel. Afin de contourner cet obstacle d'accessibilité de GrB, nous avons décidé de produire une protéine de fusion TAT-GrB qui soit capable de se servir à la fois de son domaine TAT pour s'accumuler dans les cellules cibles et de l'activité protéolytique de GrB pour déclencher l'apoptose dans ces cellules. L'objectif de ce projet consistait d'abord à caractériser biochimiquement la chimère afin de vérifier si elle répond aux critères à la base de son développement, à savoir son autonomie d'accès aux cellules cibles et sa capacité à induire l'apoptose dans ces cellules. Le deuxième but visait à déterminer le mécanisme d'induction d'apoptose de cette molécule. Les résultats issus de la caractérisation biochimique et fonctionnelle de cette molécule sont présentés dans le troisième chapitre sous la rubrique des résultats.

RESULTATS

Premier chapitre

Résumé

L'apoptose induite chez les lymphocytes T par la réticulation du récepteur TCR requiert l'activation des caspases. Or le clivage de caspase-3 a aussi été observé dans les lymphocytes T activés non-apoptotiques. Dans cet article, nous montrons que l'activation des lymphocytes T résulte en un profil de clivage des caspases beaucoup plus sélectif que celui de l'apoptose car seules caspase-3, caspase-6 et caspase-7 sont activées. Ceci a été confirmé dans les cellules intactes en utilisant des substrats perméables fluorogéniques des caspases. Le clivage de caspase-3 survient dans différentes sous-populations de cellules T (CD4, CD8, CD45RA et CD45RO) ainsi que les lymphocytes B. La voie qui mène à l'activation des caspases implique les récepteurs TNFRs et caspase-8 qui, à l'opposé de caspase-9, subissent aussi un clivage après ligation du TCR. Par ailleurs, nous montrons que l'inhibition spécifique des caspases bloque la prolifération, l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH-II) ainsi que la transformation blastique associée à l'activation des cellules. L'activité caspase résulte aussi en une dégradation sélective des substrats puisque certains de ces derniers comme PARP, Lamin B et Wee-1 sont clivés alors que d'autres, comme DFF-45 et RFC-140, restent intacts. L'ensemble de ces résultats prouve que l'activation des caspases est une réponse précoce et physiologique dans les cellules T activées non-apoptotiques et semble être impliquée dans la phase initiale de l'activation de lymphocytes.

Mots clés: TCR/Prolifération/Apoptose/Protéase/Inhibiteurs

Résumé décrivant ma contribution personnelle à cet article

Le clivage des caspases, menant à leur activation, est un processus qui était exclusivement associé à l'apoptose. Cependant, des expériences préliminaires effectuées dans notre laboratoire par les coauteurs Antoine Alam et Luchino Cohen ont montré que ces mêmes enzymes sont clivées dans des lymphocytes T non apoptotiques fraîchement activés via le récepteur TCR. Bien que très originale, cette observation a rencontré un certain scepticisme car on ne savait pas pourquoi les lymphocytes T ne subissent pas l'apoptose malgré l'activation des caspases.

Ma contribution à cet article a répondu à cette question spécifique. J'ai montré que le profil de clivage des caspases observé lors de la stimulation via le TCR était distinct de celui observé au cours de l'apoptose. En effet, lors de l'activation des lymphocytes T le profil de clivage n'était pas généralisé à toutes les caspases. Par ailleurs, ces expériences ont aussi montré que parmi les quelques caspases clivées certaines ne le sont pas complètement comme c'est le cas de caspase-8.

Ma deuxième contribution à cet article réside dans la démonstration que DFF-45, un substrat des caspases, ne subit pas de dégradation suite à la réticulation du TCR. En absence de dégradation de cette molécule, l'ADN reste intacte et ne subit pas de fragmentation. Ceci constitue une raison non négligeable qui empêcherait les lymphocytes T activés de subir l'apoptose malgré l'activation des caspases.

**Early Activation of Caspases During T Lymphocyte Stimulation Results
in Selective Substrate Cleavage in Non-Apoptotic Cells**

Antoine Alam[‡], Luchino Y. Cohen[‡], Salah Aouad, and Rafick-Pierre Sékaly^{§||¶},

**Published in The Journal of Experimental Medicine 1999 Dec 20; 190 (12):
1879-90**

From the Laboratoire d'Immunologie, Institut de Recherches Cliniques de Montréal,
110 avenue des Pins Ouest, Montréal, Canada, H2W1R7. [§]Département de
Microbiologie et d'Immunologie, Université de Montréal, Montréal, H3C3J7,
^{||}Department of Microbiology and Immunology and [¶]Department of Experimental
Medicine, McGill University, Montréal, Canada, H3A2B4.

[‡]These authors contributed equally to this work

Abstract

Apoptosis induced by T cell receptor (TCR) triggering in T lymphocytes involves activation of cysteine proteases of the caspase family through their proteolytic processing. Caspase-3 cleavage was also reported during T cell stimulation in the absence of apoptosis, although the physiologic relevance of this response remains unclear. We show here that the caspase inhibitor zVAD blocks proliferation, MHC class II expression and blastic transformation during stimulation of peripheral blood lymphocytes. Moreover, T cell activation triggers the selective processing and activation of downstream caspases (caspase-3, -6 and -7), but not caspase-1, -2 or -4, as demonstrated even in intact cells using a cell permeable fluorescent substrate. Caspase-3 processing occurs in different T cell subsets (CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ and CD45RO⁺) and in activated B lymphocytes. The pathway leading to caspase activation involves death receptors and caspase-8 which is also processed following TCR triggering, but not caspase-9 which remains as a proenzyme. Most importantly, caspase activity results in a selective substrate specificity since Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP), Lamin B and Wee1 kinase, but not DNA Fragmentation Factor (DFF45) nor Replication Factor C (RFC140) are processed. Caspase and substrate processing occur in non-apoptotic lymphocytes. Thus, caspase activation is an early and physiologic response in viable, stimulated lymphocytes and appears to be involved in early steps of lymphocyte activation.

Keywords: T cell receptor, proliferation, apoptosis, protease, inhibitor

Introduction

Cysteine proteases of the CED-3/ICE family (caspases) are critical executioners of apoptosis in several mammalian cell-death pathways¹. At present, fourteen human and murine caspases have been isolated and the exact role of each one during apoptosis has yet to be fully characterized. Caspases are synthesized as inactive precursors that require proteolytic conversion to become active proteases. For instance, during apoptosis triggered by TCR crosslinking in T lymphocytes, the 32 kD caspase-3 proenzyme is first cleaved to release fragments of 12 and 20 kD. Removal of the 3 kD propeptide from the p20 generates the p17 form associated with caspase-3 activity and apoptosis^{2,3}. Caspase-3 cleavage also occurs *in vivo* during negative selection of thymocytes through TCR signaling, where only the p17 is detected^{4,5}. This mechanism prevails in a wide variety of cellular systems and is triggered upon induction of apoptosis by a number of exogenous stimuli¹.

The current model suggests that following apoptotic stimulation, activation of "upstream" caspases containing a large prodomain such as caspase-8, -2 or -9 leads to the proteolytic cleavage of "downstream" caspases (caspase-3, -6 and -7) which mediate the apoptotic response^{1,6}. Another caspase subfamily including caspase-1, -5, -11, -12 and -13 are essentially involved in cytokine maturation and do not seem to play a critical role during apoptosis. Caspase activity results in the cleavage of several cellular proteins, which leads to the apoptotic response (see (7) for a review). These substrates include structural proteins such as gelsolin⁸, proteins involved in DNA repair such as poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)^{2,9} or DNA-PK¹⁰ and proteins involved in cell cycle regulation such as the 140 kD subunit of Replication Factor C (RFC140)¹¹, MDM2¹² or the Cdc2 kinase Wee1¹³. A critical substrate for caspase-3 during apoptosis is the DNA fragmentation factor (DFF45, ICAD), that once cleaved by caspase-3 activates DNA fragmentation by releasing the caspase-activated DNase (CAD)¹⁴⁻¹⁶.

Surprisingly, caspase-3 processing and activity have been observed in the absence of apoptosis following polyclonal activation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and in the absence of DNA fragmentation^{17,18}. However, there is no evidence yet for a role of caspases during T cell activation and a recent report suggested that the observed caspase processing was due to the production of Granzyme B by CD8⁺ activated cells and artifactual release during cell lysis of PBMCs¹⁹. However, such a role for caspases in T cell activation is indirectly supported by several recent observations. Indeed, interference with pathways leading to caspase processing, as in Fas-associated Death Domain protein (FADD) knock-out, FADD dominant negative or Bcl-2 transgenic mice, results in impaired mature T cell proliferation²⁰⁻²³. Moreover, overexpression of Bcl-2 also delays the re-entry of resting

NIH3T3 cells into cell cycle²⁴. These data suggest that inactivation of pathways leading to caspase activity results in reduced cell cycle progression in primary T lymphocytes and in cell lines.

In this study, we have investigated whether caspase processing was a physiologic response following TCR triggering. We show that a caspase inhibitor blocked T cell activation, that caspase-3 and other downstream caspases are processed in stimulated lymphocytes and that a selective cleavage of caspase substrates occurs in viable and proliferating cells. These results show that caspase activation is a physiologic response to TCR triggering and indicate that this enzymatic cascade is not only involved in induction of cell death, but might also be involved in the early steps leading to lymphocyte proliferation.

Results

The caspase inhibitor zVAD blocks anti-CD3-induced T cell activation.

Several reports have demonstrated a co-stimulatory function of TNF receptor (TNFR) family members, such as Fas and TNFR, which are also associated to apoptosis through activation of the caspase cascade²⁵⁻²⁷. Whether caspases play a role in the co-stimulatory function of TNFR family members has yet to be demonstrated, although caspase-3 processing has been reported following T cell stimulation¹⁷. To determine whether caspase-3 activation was involved in the response to TCR triggering, we used the broad-spectrum caspase inhibitor zVAD^{4, 5, 11, 28}. Stimulation of PBMCs with anti-CD3 antibody and IL-2 in the presence of zVAD resulted in a dose-dependent and reproducible inhibition of T cell proliferation (76.3 ± 7.7 % inhibition at day 4 with 100 μ M of zVAD, n=8) (Fig. 1A) and a 2.6 fold decrease in the percentage of cells in S phase after 4 days of stimulation, as assessed by DNA content analysis using propidium iodide staining (data not shown). Similar results were obtained using zIETD-fmk, an inhibitor of caspase-8-like members or the caspase-3-like protease inhibitor zDEVD-fmk (inhibition of more than 50% of the proliferation with 100 μ M in three independent experiments, data not shown).

To exclude the possibility that zVAD exerts a general cytostatic effect, the caspase inhibitor was added at 1 to 3 days following stimulation of PBMCs and DNA synthesis was assessed after 4 days of culture. Inhibition of T cell proliferation by zVAD was much less significant when added 2 or 3 days after T cell activation (Fig. 1B), indicating that it did not inhibit a component of the cell cycle machinery and was not endowed with a non-specific cytostatic activity. A toxic effect of zVAD was also excluded since with a 73% inhibition of proliferation, the percentage of AV⁺ cells was 56.7 % in the presence of zVAD versus 57.3 % in the absence of zVAD (data not shown). Anti-CD3-induced blastic transformation was also abolished by zVAD, as assessed by light scatter properties in flow cytometry (Fig. 1C), confirming that inhibition of caspase activity blocked an early and critical step of T cell activation. Addition of zVAD also resulted in the accumulation of cells expressing the early and transient activation marker CD69, while surface expression of the late activation marker HLA-DR was inhibited (Figure 1D). Induction of CD25 (the alpha chain of the high affinity IL-2 receptor) and CD95 upregulation remained comparable in the presence or absence of zVAD (Fig. 1D and data not shown). Since an excess of IL-2 is added at the onset of T cell activation and since the expression of CD25 is maintained in the presence of zVAD, it appears that the caspase inhibitor does not block T cell proliferation by interfering with the

IL-2/IL-2R autocrine loop. As illustrated in Figure 1D, the lack of effect of zVAD on the *de novo* expression of CD69 and CD25 and the fact that Jurkat cell proliferation was not affected by addition of zVAD (data not shown) further confirm that zVAD effect on T cell proliferation cannot be attributed to a general cytostatic effect.

Engagement of CD3 on PBMCs induces the production of cytokines by monocytes such as IL1- β and Interferon-gamma Inducible Factor (IGIF/IL-18) which in turn will enhance T cell activation^{29,30}. Since production of these cytokines is dependent on caspase-1 (ICE) activity^{31,32}, inhibition of T cell proliferation by zVAD could be due to a lower level of costimulatory cytokines produced by monocytes. To exclude this possibility, purified T cells (>95% TCR⁺) were stimulated with anti-CD3 and IL-2 in the presence of zVAD. Proliferation of these T cells triggered by anti-CD3 and IL-2 was also blocked by the caspase inhibitor (Fig. 1E), confirming that zVAD was directly inhibiting T cell activation and not accessory cell function. Taken together, these results show that inhibition of caspase activity resulted in defective T cell activation and impaired proliferation following TCR triggering of resting T cells.

Early processing of caspase-3 during activation of resting lymphocytes

To rule out the possibility that caspase-3 processing induced by TCR triggering resulted from a lysis artifact¹⁹, anti-CD3-activated PBMCs were boiled directly in Laemli buffer containing 2% SDS, 5% mercaptoethanol and 8 M urea and cell lysates were subjected to western blot analysis. Even under these denaturing conditions, caspase-3 proenzyme was reproducibly found (n=10) completely processed into protein species ranging from 24 to 17 kD following TCR triggering of PBMCs (Fig. 2). These species included the 17 kD form previously associated to the induction of apoptosis²⁻⁵ and a doublet migrating at around 20 kD. Processing of caspase-3 occurred as early as day 1 following TCR stimulation and prior to the detection of DNA synthesis (Fig. 2A). None of these bands were observed in resting T cells. The same caspase-3 pattern was also obtained following anti-TCR or PHA/IL-2 stimulation (data not shown), confirming previous results¹⁷. A role for Granzyme B in the processing of caspase-3 during cell lysis was excluded by using the same denaturing lysis buffer in all experiments.

To determine which of these bands constituted the active enzyme, their ability to bind to a peptidic substrate was assessed by affinity blot. The affinity blot technique takes advantage of the ability of peptides mimicking caspase substrates to bind irreversibly to the active caspases but not to their precursors³³. Fresh PBMCs were stimulated during 4 days with anti-CD3, anti-TCR antibody or PHA in the presence of IL-2 and cell lysates were incubated with a biotinylated zVAD-fmk peptide. Proteins

were separated by SDS-PAGE and the blot was probed using Horseradish peroxidase-conjugated Extravidin (Extra-HRP). Three forms ranging from 17 to 21 kD were detected in lysates of activated, but not resting cells (Fig. 2C). To verify whether these proteins originated from caspase-3, the caspase was immunoprecipitated from lysates of PHA-stimulated PBMCs using the antiserum and whole lysates (Lys) or immunoprecipitated proteins (IP) were separated on SDS-PAGE. Western blot analysis (Fig. 2D, left panel) shows that the immunoprecipitate contained a doublet at 20 kD as well as the 17 kD subunit and a 15 kD band sometimes observed in late apoptotic Jurkat cells using this antiserum (data not shown). When the membrane was probed with Extra-HRP, only the 17 kD band and the upper band from the doublet were detected (Fig. 2D, right panel), showing that both caspase-3 forms were able to bind to the synthetic substrate.

Activation of caspase-3 was also assessed in intact cells using the cell permeable caspase substrate Phiphilux-G₁D₂ containing the caspase-3 consensus sequence GDEVDGI⁽³⁴⁾. Fluorescence of resting or stimulated PBMCs was compared by flow cytometry following staining in the presence of the substrate. Figure 2E shows that Phiphilux was cleaved in T cells 4 days following anti-CD3 stimulation. Similar results were also obtained as early as two days of stimulation in which a 4.7 increase in mean fluorescence intensity was observed (MFI of 27.3 vs 5.8 for resting cells). Interestingly, induction of apoptosis by anti-Fas antibody did not result in increased Phiphilux cleavage in activated PBMCs (Fig 2E), suggesting that caspase activity was already elevated in proliferating cells. Therefore, caspase-3 cleavage in stimulated lymphocytes corresponded to activation of the proenzyme.

The complex pattern of caspase-3 subunits suggested that they could originate from several proenzyme species observed in non stimulated cells (Fig. 2B) or from different cell subsets. To distinguish between these two possibilities, sorting of CD4⁺, CD8⁺, CD45RO⁺ and CD45RA⁺ cells was performed on viable, blastic cells. Processing of caspase-3 was similar in both CD4 and CD8 T cell subsets and occurred not only in CD45RO⁺ but also in the remaining CD45RA⁺/CD25⁺ cells (Fig. 3A, B), further confirming that caspase activation was an early event following TCR triggering. When PBMCs were stimulated for 4 days with the B cell mitogen SAC and B lymphocytes were purified by CD19⁺ cell sorting, caspase-3 cleavage was observed in sorted, viable cells and resulted in the production of the 20 kD doublet and the 17 kD large subunit as in activated T lymphocytes (Fig. 3C). These results indicate that caspase-3 processing occurs in several T cell subsets and in activated B cells.

Selective activation of the caspase cascade following TCR triggering.

Having confirmed caspase-3 activation in stimulated T lymphocytes, we next considered whether other caspases could also be activated under the same conditions. Western blot analysis was performed on lysates of unstimulated or activated PBMCs, using a panel of antibodies recognizing several caspases. Figure 4A shows that caspase-6 and caspase-7 were also cleaved into their active subunits following TCR triggering. A decrease in levels of both proenzymes (p34 for caspase-6 and p35 for caspase-7) occurred already after 24h of stimulation and their cleaved subunits (p20 and p17) were clearly detected 24 hours later. However, caspase processing was selective since caspase-1, caspase-2, and caspase-4 remained as proenzymes under these same conditions (Fig. 4B). These results further exclude a role for Granzyme B since one of its substrates, caspase-2³⁵, remained as a proenzyme in activated cell lysates.

Processing of effector caspases results from the activation of caspase-8

Activation of the downstream caspases during apoptosis is usually triggered by either caspase-8 (associated to the cytoplasmic tail of death receptors) or caspase-9 (activated through cytochrome c release from mitochondria) depending on the apoptotic stimulus³⁶⁻³⁹. To identify the pathway involved in caspase-3, -6, and -7 activation during T lymphocyte stimulation, western blot analysis was performed using antibodies against caspase-8 or caspase-9. Figure 5 shows that following stimulation of PBMCs, caspase-8 was fragmented into a 43-45 kD doublet corresponding to the large subunit of caspase-8 linked to the propeptide⁴⁰ while the 18 kD large subunit was detected only at day 3 (observed in at least three independent experiments), when levels of DNA synthesis were already high (Fig. 1A and 2). This result was confirmed using another anti-caspase-8 serum also specific for the p18 (data not shown). In the same extracts, caspase-9, which was upregulated following TCR triggering, remained as a proenzyme (Fig. 5B) whereas caspase-8 and -3 were processed as early as 16h after T cell activation. Therefore, these results suggest that caspase-8-mediated processing of the downstream caspases was triggered through upregulation of death receptor ligands and FADD recruitment following T cell activation.

Caspase substrate specificity in activated lymphocytes

Since several downstream caspases were activated following TCR triggering, we next determined whether caspase substrates were processed in stimulated lymphocytes. PARP was the first caspase-3 substrate identified during apoptosis^{2,9}. Stimulation with anti-CD3 and IL-2 increased PARP protein levels within 24 hours (Fig.

6), confirming previous reports showing an upregulation of PARP message and activity following PHA stimulation of primary T lymphocytes^{41,42}. Concomitant with its induction, more than 90% of PARP protein was found cleaved in activated cell lysates (Fig. 6 and see Fig. 8). PARP fragment co-migrated in the same gel with the 85 kD form found in apoptotic Jurkat cell extracts, further confirming that caspase activity was induced following primary T cell activation. Another recently identified caspase substrate, the Cdc2 tyrosine kinase Wee1¹³, was also upregulated in stimulated PBMCs (Fig. 6). Interestingly, the 97 kD full length Wee1 which appeared 48h after stimulation was always detected along with 65, 34 and 32 kD bands which result from caspase-mediated cleavage during Fas-mediated apoptosis in Jurkat cells (Fig. 6 and ref. 13). Therefore, two caspase substrates, PARP and Wee1, were processed in activated T cells in a pattern expected from their cleavage by caspases.

Caspase-mediated cleavage of substrates such as DFF45 or RFC140 in activated T lymphocytes would not be compatible with the maintenance of DNA integrity and the proliferation of T cells, since they play a critical role in DNA fragmentation and DNA synthesis, respectively. Thus, it was of interest to determine whether caspase activation in stimulated lymphocytes resulted in cleavage of these substrates. The same extracts analyzed for PARP and Wee1 cleavage were subjected to western blot analysis using an anti-DFF45 antiserum generated against the full length DFF45. Results shown in Fig. 6 demonstrate that DFF45 was not cleaved in these lysates, although caspase-3 was almost completely processed (Fig. 6). The cleavage of RFC140 was analyzed by western blot and results confirmed that this substrate was also resistant to caspase-mediated cleavage in activated lymphocytes, as we have previously observed (11, and data not shown).

To ensure that Wee1 and PARP cleavage resulted from caspase activity, fresh PBMCs were stimulated with anti-CD3 antibody and IL-2 in the absence or the presence of 100 μ M of zVAD. Western blot analysis of cell lysates shows that Wee1 cleavage to a 60 kD fragment and the appearance of the 85 kD form of PARP were both inhibited by zVAD (Fig. 7A). Interestingly, addition of zVAD, which inhibited T cell proliferation, also reduced caspase-3 processing (Fig. 7A), further supporting a correlation between caspase-3 activation and cell cycle entry. The caspase-6 substrate Lamin B⁷ was also analyzed by western blot in lysates of activated lymphocytes and a zVAD-sensitive cleavage generating a 28 and a 35 kD fragments was observed in stimulated cells (Fig. 7A), further confirming that caspase-6 was active in these cells. As previously published, cleavage of RFC140 was detectable in activated PBMCs only after anti-Fas treatment¹¹. To ensure that this was also the case for DFF45, anti-CD3-stimulated PBMCs were incubated during 6h on anti-Fas coated plates at 37°C and

subjected to western blot analysis using anti-DFF45 antiserum. This treatment resulted in a decrease of living, AV⁻ cells from 65 to 20 % (Fig. 7B). Western blot analysis demonstrated that the 14 kD fragment of DFF45 was only detectable in lysates of apoptotic cells. Therefore, caspase activity observed in proliferating T cells resulted in selective substrate specificity, different than the one observed during T cell apoptosis.

Caspase and substrate cleavage occur in proliferating and non-apoptotic cells

In order to rule out a potential contribution of dying cells for cleaved forms of caspases or for their substrates, western blot analysis was performed on highly purified living cells. PBMCs were stimulated during 4 days using anti-CD3 antibody in the presence of IL-2 and stained with AV-FITC. Purified living (AV⁻) or dying (AV⁺) cells were obtained by flow cytometric cell sorting. The sorted populations were restained with AV to ensure that sorting did not affect cell viability and more than 92% of the cells were found AV⁻. Lysates of sorted cells were subjected to caspase-3 or PARP western blot analysis. Results show that all the processed forms of caspase-3, as well as the 85 kD fragment of PARP were present in AV⁻ cells (Fig. 8A), further confirming that the presence of caspase-3 cleavage products was not due to contamination with dead cells. In non-apoptotic sorted cells, the caspase-3 substrate PARP was almost completely cleaved, showing that caspase-3 processing correlated with caspase activity. Strikingly, caspase-3 processed forms were almost absent in lysates of apoptotic (AV⁺) cells, suggesting that their half life could be very short. Confirming this hypothesis, we have observed that caspase-3 cleaved forms progressively disappear from activated lymphocytes following IL-2 withdrawal, concomitantly with an increase in mortality (up to 70%, data not shown).

To ensure that cleavage of other caspases or substrates also occurred in non-apoptotic cells, PBMCs stimulated during 2 days (to further limit the proportion of apoptotic cells) with anti-CD3 antibody were stained with AV-FITC and after gating on blasts, AV⁻ cells were sorted by flow cytometry. Extracts from 5×10^5 cells were prepared from resting, unsorted PBMCs or activated, AV⁻ sorted cells and proteins were analyzed by western blot using antibodies against caspase-6, caspase-7, PARP and Wee1. As a control for dead cell contamination, these extracts were also analyzed for DFF45 cleavage. Figure 8B shows that both caspases, as well as PARP and DFF45, were not cleaved in resting cells (lane 1) whereas Wee1 was not detected. Following TCR cross-linking, caspase-6 and caspase-7 cleaved subunits were detected in AV⁻ sorted cells (lane 2), as well as the PARP 85 kD cleaved form and the 66, 32 and 34 kD fragments of Wee1. In these extracts, DFF45 was not processed, excluding a potential

contamination by dead cells. Altogether, these results clearly indicate that a selective caspase substrate cleavage occurs in viable T lymphocytes activated through the TCR.

Discussion

Results presented in this report show that caspase activation following TCR triggering is a physiologic, tightly regulated and early response that appears to be required for efficient T cell activation. Indeed, the selective processing of caspase-3, -6, -7 and -8 was detected within 24 hours following anti-CD3 stimulation of peripheral blood lymphocytes. Caspase processing occurred in various T and B cell subsets and was found in proliferating and non-apoptotic lymphocytes. Activation of caspases was confirmed through binding of caspase-3 processed forms to a specific substrate and by showing that a cell permeable substrate was cleaved in intact, activated lymphocytes. Importantly, activation of the caspase cascade was associated to restricted substrate specificity with cleavage of PARP and Wee1 being observed while two other substrates, DFF45 and RFC140 remained unaffected. Caspase processing following T cell stimulation correlated with a defective lymphocyte activation in the presence of the caspase inhibitor zVAD, suggesting that caspase activity could be involved in some early steps of lymphocyte activation.

Death receptors such as TNF receptor (TNFR) and Fas can act as costimulatory molecules and enhance T cell proliferation²⁵⁻²⁷. We have also observed that a soluble form of TNFR significantly inhibited T cell proliferation induced by anti-CD3 antibody (S. Aouad *et al*, unpublished results). Cross-linking of these death receptors triggers the FADD-dependent recruitment of caspase-8, which is processed and can directly mediate the activation of caspase-3, -6 and -7 by proteolytic cleavage^{36,37}. Our results show that caspase-8 is processed following T cell stimulation (as soon as 16h following TCR crosslinking) and activates caspase-3, -6, and -7, leading to a selective cleavage of their substrates. Interestingly, addition of the caspase-8 inhibitor zIETD during T cell stimulation inhibited over 60% of the proliferation (data not shown), which further confirms that caspase-8 activity is involved in cell cycle entry of activated lymphocytes. The fact that activation of the whole caspase cascade occurs in proliferating, viable (AV⁺) cells, indicates that caspases could be the executioners in the co-stimulatory function of members of the TNFR family. In support of this hypothesis, impaired T-cell proliferation is also observed in FADD-deficient and in FADD dominant-negative transgenic mice²⁰⁻²², also suggesting a potential role for caspases in the early events leading to cell division. Caspase processing in stimulated cells appears to be mediated mostly through the activation of caspase-8 associated to death receptor. The other pathway of downstream caspase activation involves caspase-9, which is triggered following the release in the cytosol of mitochondrial cytochrome c^{38,39}. However, we have found that in stimulated T cells this caspase remains as a proenzyme.

Bcl-2 and other anti-apoptotic members of the family have been shown to block caspase activation following several apoptotic stimuli⁴³. However, Bcl-2 is also endowed with the ability to influence cell cycle progression. Indeed, Bcl-2 overexpression in transgenic mice was reported to decrease cell cycle entry of primary lymphocytes²³. Transfection of Bcl-2 into NIH3T3 cells also delayed their re-entry into cell cycle following serum withdrawal and a tyrosine 28 mutant in the N-terminal BH4 domain exhibited dominant negative effects over the wild-type Bcl-2²⁴. Whether the effect of Bcl-2 on cell cycle progression also involves regulation of caspase activity remains to be addressed. However, these data associated with our results showing the inhibitory effect of zVAD on DNA synthesis, suggest that caspases (along with their upstream regulators FADD and Bcl-2) may be involved in cell cycle entry during lymphocyte activation.

Results presented in this study clearly demonstrate a selective processing of caspase substrates. PARP, which is involved in DNA repair⁴⁴, is probably processed in apoptotic cells to allow for DNA fragmentation following DFF45 cleavage. Of note, PARP expression and activity increases following T cell stimulation⁴¹. Therefore, the 85 kD fragment of PARP probably conserves an enzymatic activity which mediates an unknown function in proliferating cells. Our results also demonstrate the selective processing of Wee1. This tyrosine kinase is a negative regulator of Cdc2⁴⁵, a cyclin-dependent kinase required for the G₂/M transition during cell cycle, as well as for Fas-mediated apoptosis in immortalized cell lines¹³. Wee1 is a critical component of the G₂/M cell cycle checkpoint machinery and mediates cell cycle arrest following DNA damage by phosphorylation of Cdc2⁴⁵. Therefore, cleavage of Wee1 in proliferating lymphocytes could lead to its inactivation, thus allowing cell cycle progression. Of note, Wee1 processing by caspases during apoptosis in Jurkat cells correlates with a 20-fold decrease in Wee1 activity and an increase in Cdc2 activity¹³. The nuclear protein Lamin B is considered as a caspase-6 substrate⁷. Our results show that in fresh PBMCs, two forms of 66 and 45 kD can be identified by western blot using an anti-Lamin B antibody and at least two fragments of 35 and 28 kD are produced following T cell activation. Appearance of these products correlates with a decrease in the amount of the 45 kD form of Lamin B and is inhibited by addition of zVAD (Fig 7A). Although the significance of this cleavage in activated lymphocytes is unclear, it confirms the activation of caspase-6 which generates the 28 kD fragment following a cleavage at the consensus sequence VEID⁷.

In our experiments, DFF45 is present in resting as well as in proliferating cells whereas RFC140 is upregulated following T cell stimulation. Since caspase-mediated DFF45 processing leads to DNA fragmentation, one could easily predict that it would

not be cleaved in activated living cells. Indeed, we were unable to detect DFF cleavage in AV⁻ cells following T cell activation, although the 14 kD fragment generated by caspase-3 cleavage at the second site was observed in lysates activated lymphocytes following anti-Fas treatment. The lack of RFC140 cleavage in proliferating T cells was also critical since processing of RFC140 by caspases leads to inactivation of the DNA replication machinery and cell cycle arrest at the G₂/M boundary¹¹. This selective substrate processing could explain why T lymphocytes survive and proliferate although the caspase cascade including caspase-8, -3, -6, and -7 is activated following TCR triggering. To explain this selective caspase specificity in stimulated lymphocytes, several hypotheses can be proposed. Endogenous caspase inhibitors such as the Inhibitor of Apoptosis (IAP) family members could selectively inhibit the cleavage of specific substrates in stimulated cells⁴⁶. Supporting this hypothesis, the expression of TIAP (for Thymic IAP), a murine homologue of Survivin, is upregulated within 24h of stimulation in splenic T cells⁴⁷ and this member of the IAP family was shown to inhibit already processed caspase-3, -7, and -9⁴⁶. Association of TIAP to caspases could have a differential effect on the cleavage of their substrates, depending on the affinity of the caspase for these substrates or their accessibility. Alternatively, some caspase substrates involved in cell survival could be protected against cleavage by phosphorylation near the caspase cleavage site. This mechanism was recently demonstrated for presenilin-2. Caspase-mediated cleavage of this molecule was abrogated by Ser³²⁷ and Ser³³⁰ phosphorylation inside the consensus cleavage site DSYD↓S⁴⁸.

In summary, activation of the caspase cascade in non-apoptotic lymphocytes, together with the impairment of T cell activation by caspase inhibitors, indicates that these proteases may play an important role during T cell stimulation and caspases may be added to the growing list of molecules which are involved in cell death and proliferation. However, elucidation of the function of caspase processing in activated lymphocytes will require further experiments and will provide new insights in the biological function of caspases, as well as the regulation of T cell activation.

Annexe du premier chapitre

MECANISME D'ACTIVATION DES CASPASES LORS DE LA PROLIFERATION DES LYMPHOCYTES T

Résultats et discussion des travaux annexes

Les travaux présentés dans ce chapitre ont permis d'étendre le champ d'intervention des caspases à une étape insoupçonnée de la réponse immune, l'activation des lymphocytes T. Cette étude a réussi aussi à mettre en évidence le profil d'activation particulier des caspases lors de cette phase et à révéler la contribution de ces protéases à l'activation des lymphocytes T. Cependant, au cours de ces travaux nous n'avions pas eu l'occasion d'explorer le mécanisme d'activation de ces cystéine protéases dans ce contexte non-apoptotique de la réponse immune. Dans cette annexe, nous présentons une partie représentative des résultats issus de l'étude qui a servi à soulever cette question.

La famille des TNFRs renferme un groupe de récepteurs appelés récepteurs de mort ou (DRs) tels que TNFR-I, Fas, DR3, DR4 et DR5¹. Ces récepteurs présentent tous la séquence intracellulaire essentielle à la transduction des signaux appelée "death domain" (DD)². Suite à leur oligomérisation ces récepteurs forment un complexe de signalisation (DISC) issu du recrutement de certaines molécules de signalisation dont caspase-8 et probablement caspase-10³. Ces récepteurs constituent l'une des deux voies majeures de l'élimination des lymphocytes T par apoptose et ont été, de ce fait, identifiés grâce à cette capacité pro-apoptotique. Cependant, l'expression de tels récepteurs est augmentée immédiatement après l'activation des lymphocytes T, bien avant la phase apoptotique de ces cellules. De même, certains de ces récepteurs se sont avérés capables d'amplifier cette activation des cellules T (co-stimulation)⁴. Tenant compte de l'implication de ces DRs dans l'activation des lymphocytes T et de leur capacité d'interagir avec certaines caspases nous nous sommes demandés si l'activation des caspases observée lors de la prolifération des cellules T résulte de la réticulation des DRs.

Afin de vérifier cette hypothèse nous avons étudié l'effet d'un récepteur recombinant soluble, TNFR-Fc, sur l'activation des caspases issue de la stimulation du TCR. Ce récepteur recombinant étant capable de séquestrer le ligand TNF résultant de la stimulation du TCR devrait prévenir l'oligomérisation et la signalisation des récepteurs TNFR-I et TNFR-II exprimés à la surface des lymphocytes T activés. De ce fait, si l'activation des caspases issue de la stimulation des cellules T via le TCR résulte

réellement de la réticulation des TNFRs par leur ligand TNF, nous devrions être capables de bloquer cette activation avec le récepteur neutralisant mentionné ci-dessus.

Nous avons stimulé une suspension cellulaire hautement enrichie en lymphocytes T (>95%) via le TCR et ce, en présence et en absence du récepteur soluble. Ensuite, nous avons étudié l'effet de ce récepteur sur la prolifération des cellules T en analysant l'incorporation de la thymidine et son effet sur l'activation de caspase-3 à l'aide de western blot.

Les résultats décrits dans cette rubrique montrent que l'addition du TNFR recombinant soluble (TNFR-Fc), au moment de l'activation des cellules T via le TCR, résulte en une réduction drastique de la prolifération comme le révèle la réduction d'incorporation de la thymidine (Figure annexe A). L'analyse au FACS de l'intégrité des cellules à l'aide du double marquage AnV/PI montre que cette inhibition n'est pas due à une éventuelle toxicité du récepteur utilisé car les cellules issues des différentes conditions restent complètement viables (Figure annexe B). Finalement, l'analyse de l'état d'activation de caspase-3 par western blot a montré que le récepteur neutralisant est effectivement capable d'inhiber l'activation de cette caspase sous l'effet de la ligation du TCR (Figure annexe C). Ce résultat démontre clairement que l'activation des caspases, issue de la stimulation des cellules T, résulte de la ligation du TNFR désignant ainsi cet événement comme le mécanisme d'activation des caspases lors de la prolifération des lymphocytes T. Cette observation est importante non seulement parce qu'elle dévoile le mécanisme d'activation des caspases dans la phase initiale non-apoptotique de la réponse immune mais parce qu'elle révèle le fait que l'activation des caspases lors de la prolifération des lymphocytes T ainsi que pendant leur apoptose résulte invariablement du même événement moléculaire, la ligation des DRs à la surface de ces cellules.

Reference list

1. Thornberry, N.A., and Y. Lazebnik. 1998. Caspases: enemies within. *Science*. 281:1312-1316.
2. Nicholson, D.W., A. Ali, N.A. Thornberry, J.P. Vaillancourt, C.K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, P.R. Griffin, M. Labelle, Y.A. Lazebnik, N.A. Munday, S.M. Raju, M.E. Smulson, T.T. Yamin, V.L. Yu, and D.K. Miller. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 376:37-43.
3. Han, Z., E.A. Hendrickson, T.A. Bremner, and J.H. Wyche. 1997. A sequential two-step mechanism for the production of the mature P17:P12 form of caspase-3 *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 272:13432- 13436.
4. Clayton, L.K., Y. Ghendler, E. Mizoguchi, R.J. Patch, T.D. Ocaín, K. Orth, A.K. Bhan, V.M. Dixit, and E.L. Reinherz. 1997. T-cell receptor ligation by peptide/MHC induces activation of a caspase in immature thymocytes : the molecular basis of negative selection. *EMBO J.* 16:2282-2293.
5. Alam A., M.Y. Braun, F. Hartgers, S. Lesage, L. Cohen, P. Hugo, F. Denis, and R.P. Sékaly. 1997. Specific activation of the cysteine protease CPP32 during the negative selection of T cells in the thymus. *J. Exp. Med.* 186:1503-1512.
6. Thornberry, N.A., T.A. Rano, E.P. Peterson, D.M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V.M. Houtzager, P.A. Nordstrom, S. Roy, J.P. Vaillancourt, K.T. Chapman, and D.W. Nicholson. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272:17907-17911.
7. Denis, F., E. Rheaume, S.M. Aouad, A. Alam, R.P. Sekaly, and L.Y. Cohen. 1998. The role of caspases in T cell development and the control of immune responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 54:1005-1019.
8. Kothakota, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T.J. McGarry, M.W. Kirschner, K. Kohts, D.J. Kwiatkowski, and L.T. Williams. 1997. Caspase-3-generated fragments of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278:294-298.

9. Tewari, M., L.T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zheng, D.R. Beidler, G.G. Poirier, G.S. Salvesen, and V.M. Dixit. 1995. YAMA/ CPP32b, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81:801-809.
10. Song, Q., S. P. Lees-Miller, S. Kumar, Z. Zhang, D.W. Chan, G.C. Smith, S.P. Jackson, E.S. Alnemri, G. Litwack, K.K. Khanna, and M.F. Lavin. 1996. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J.* 15:3238-3246.
11. Rhéaume, E., L.Y. Cohen, F. Uhlmann, C. Lazure, A. Alam, J. Hurwitz, R.P. Sékaly, and F. Denis. 1997. The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis. *EMBO J.* 16:6346-6354.
12. Erhardt, P., K. J. Tomaselli, and G.M. Cooper. 1997 Identification of the MDM2 oncoprotein as a substrate for CPP32-like apoptotic proteases. *J. Biol. Chem.* 272:15049-15052.
13. Zhou, BB, H. Li, J. Yuan, and M.W. Kirschner. 1998. Caspase-dependent activation of cyclin-dependent kinases during Fas-induced apoptosis in Jurkat cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95:6785-6790.
14. Liu, X., H. Zou, C. Slaughter, and X, Wang. 1997. DFF45, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-184.
15. Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391:96-99.
16. Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, and S. Nagata. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.
17. Miossec, C., V. Dutilleul, F. Fassy, and A. Diu-Hercend. 1997. Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation. *J. Biol. Chem.* 272:13459-13462.

18. Wilhelm, S., H. Wagner, and G. Hacker. 1998. Activation of caspase-3-like enzymes in non-apoptotic T cells. *Eur. J. Immunol.* 28:891-900.
19. Zapata, J.M., R. Takahashi, G.S. Salvesen, and J.C. Reed. 1998. Granzyme release and caspase activation in activated human T-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273:6916-6920.
20. Zhang, J., D. Cado, A. Chen, N.H. Kabra, and A. Winoto. 1998. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392:296-300.
21. Newton, K., A.W. Harris, M.L. Bath, K.G.C. Smith, and A. Strasser. 1998. A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO J.* 17:706-718.
22. Zornig, M., A.O. Hueber, and G. Evan. 1998. p53-dependent impairment of T-cell proliferation in FADD dominant-negative transgenic mice. *Curr. Biol.* 8:467-470.
23. O'Reilly, L.A., D.C. Huang, and A. Strasser. 1996. The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *EMBO J.* 15:6979-6990.
24. Huang, D.C., L.A. O'Reilly, A. Strasser, and S. Cory. 1997. The anti-apoptotic function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J.* 16:4628-4638.
25. Alderson, M.R., R.J. Armitage, E. Maraskovsky, T.W Tough, E. Roux, K. Schooley, F. Ramsdell, and D. Lynch. 1993. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 178:2231-2235.
26. Alderson, M.R., T.W Tough, S. Braddy, Davis-Smith, E. Roux, K. Schooley, R E. Miller, and D. Lynch. 1994. Regulation of apoptosis and T cell activation by Fas-specific mAb. *Int. Immunol.* 6:1799-1806.
27. Yuan, J. 1997. Transducing signals of life and death. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:247-251.

28. Jurgensmeier, J.M., Z. Xie, Q. Deveraux, L. Ellerby, D. Bredesen, and J.C. Reed. 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95:4997-5002.
29. Dinarello, C. A. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87:2095-2147.
30. Kohno, K., J. Kataoka, T. Ohtsuki, Y. Suemoto, I. Okamoto, M. Usui, M. Ikeda, and M. Kurimoto. 1997. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J. Immunol.* 158:1541-1550.
31. Thornberry, N.A., H.G. Bull, J.R. Calaycay, K.T. Chapman, A.D. Howard, M.J. Kostura, D.K. Miller, S.M. Molineaux, J.R. Weidner, J. Aunins, K.O. Elliston, J.M. Ayala, F.J. Casano, J. Chin, G.J.-F. Ding, L.A. Egger, E.P. Gaffney, G. Limjuco, O.C. Palyha, S.M. Raju, A.M. Rolando, J.P. Salley, T.T. Yamin, T.D. Lee, J.E. Shively, M. MacCross, R.A. Mumford, J.A. Schmidt, and M.J. Tocci. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356:768-774.
32. Ghayur, T., S. Banerjee, M. Hugunin, D. Butler, L. Herzog, A. Carter, L. Quintal, L. Sekut, R. Talanian, M. Paskind, W. Wong, R. Kamen, D. Tracey, and H. Allen. 1997. Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* 386:619-623.
33. Faleiro, L., R. Kobayashi, H. Fearnhead, Y. and Lazebnik. 1997. Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *EMBO. J.* 16:2227-2281.
34. Finucane, D.M., E. Bossy-Wetzell, N.J. Waterhouse, T.G. Cotter, and D.R. Green. 1999. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* 274:2225-2233.
35. Harvey, N.L., J.A. Trapani, T. Fernandes-Alnemri, G. Litwack, E.S. Alnemri, and S. Kumar. 1996. Processing of the Nedd2 precursor by ICE-like proteases and granzyme B. *Genes Cells* 1:673-685.

36. Nunez, G., M.A. Benedict, Y. Hu, and N. Inohara. 1998. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17:3237-3245.
37. Van de Craen, M., G. Van Loo, W. Declercq, P. Schotte, I. Van den brande, S. Mandruzzato, P. Van der Bruggen, W. Fiers, and P. Vandenameele. 1998. Molecular cloning and identification of murine caspase-8. *J. Mol. Biol.* 284:1017-1026.
38. Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri, and X. Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
39. Slee, E.A., M.T. Harte, R.M. Kluck, B.B. Wolf, C.A. Casiano, D.D. Newmeyer, H.G. Wang, J.C. Reed, D.W. Nicholson, E.S. Alnemri, D.R. Green, and S.J. Martin. 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.
40. Medema, J.P., C. Scaffidi, F.C. Kischkel, A. Shevchenko, M. Mann, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16:2794-2804.
41. Berger, N.A., J.W. Adams, G.W. Sikorski, S.J. Petzold, and W.T. Shearer. 1978. Synthesis of DNA and poly(adenosine diphosphate ribose) in normal and chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 62, 111-118.
42. Menegazzi, M., F. Gerosa, M. Tommasi, K. Uchida, M. Miwa, T. Sugimura, and H. Suzuki. 1988. Induction of poly(ADP-ribose) polymerase gene expression in lectin-stimulated human T lymphocytes is dependent on protein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 156:995-999.
43. Reed, J.C. 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17:3225-3236.
44. De Murcia, J.M., C. Niedergang, C. Trucco, M. Ricoul, B. Dutrillaux, M. Mark, F.J. Oliver, M. Masson, A. Dierich, M. LeMeur, C. Walztinger, P. Chambon, and G. De Murcia. 1997. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94:7303-7307.

45. McGowan, C.H., and P. Russell. 1993. Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34^{cdc2} exclusively on Tyr15. *EMBO J.* 12:75-85.
46. Devereaux, Q.L., and J.C. Reed. 1999. IAP family proteins - Suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13:239-252.
47. Kobayashi, K., M. Hatano, M. Otaki, T. Ogasawara, and T. Tokuhsa. 1999. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1457-1462.
48. Walter, J., A. Schindzielorz, J. Grunberg, and C. Haass. 1999. Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retards progression of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1391-1396.

Bibliographie de l'annexe

1. Locksley,R.M., N.Killeen, and M.J.Lenardo. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487-501.
2. Kischkel,F.C., S.Hellbardt, I.Behrmann, M.Germer, M.Pawlita, P.H.Krammer, and M.E.Peter. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14:5579-5588.
3. Muzio,M., A.M.Chinnaiyan, F.C.Kischkel, K.O'Rourke, A.Shevchenko, J.Ni, C.Scaffidi, J.D.Bretz, M.Zhang, R.Gentz, M.Mann, P.H.Krammer, M.E.Peter, and V.M.Dixit. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85:817-827.
4. Alderson,M.R., T.W.Tough, T.Davis-Smith, S.Braddy, B.Falk, K.A.Schooley, R.G.Goodwin, C.A.Smith, F.Ramsdell, and D.H.Lynch. 1995. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 181:71-77.

Methods

Reagents and antibodies. The broad spectrum (zVAD-fmk), the caspase-3-like (zDEVD-fmk), or caspase-8-like (zIETD-fmk) caspase inhibitors and the biotinylated zVAD-fmk were purchased from Enzyme Systems Products (Dublin, CA, USA). IL-2 was obtained from the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program and phytohemagglutinin (PHA) from Murex Diagnostics (Guelph, ON, Canada). *Staphylococcus aureus* Cowan fixed cells (SAC) were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Rabbit antiserum against caspase-3 was generated as described previously⁵. The anti-caspase-8 and anti-DFF45 antisera are rabbit polyclonal antibodies generated in the laboratory against the p18 of caspase-8 and the full length DFF45, respectively. The anti-PARP antiserum, a second anti-caspase-8 serum, the anti-Lamin B and anti-Fas (M3) monoclonal antibodies were generous gifts from Dr. G. Poirier (CHUL, Quebec, Canada), Dr. M. Peter (Heidelberg, Germany), Dr. R. Bertrand (Centre de Recherche du CHUM, Montreal, Canada), and Dr. D. Lynch (Immunex, Seattle, USA), respectively. Dr. D.W. Nicholson (Merck-Frosst, Kirkland, Canada) generously provided anti-sera against caspase-1, -6, -7 and -9. The monoclonal antibodies against caspase-2, caspase-4 and Wee-1 were purchased from Transduction Laboratory (Lexington, KY), Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, CA, USA) and Stressgen (Victoria, BC, Canada), respectively while the anti-CD3 was produced and purified from the OKT3 clone (ATCC).

PBMC isolation and proliferation assay. PBMCs were purified by Ficoll-Hypaque and resuspended in 10% FCS-RPMI medium (Gibco-BRL). To monitor proliferation, 10^5 cells were cultured for 1 to 4 days at 37°C in 96-well plates in the absence or presence of 1 µg/ml anti-CD3, anti-TCR (BMA031, Immunotech) or PHA and 20 U/ml rHuIL-2. For B cell stimulation, PBMCs were cultured in the presence of SAC ($1:10^4$ v/v). [³H]-labeled thymidine (1 µCi/well) was added during the last 6h for each time-point. Cells were harvested and DNA-associated radioactivity was counted by liquid scintillation (BetaplateTM, Wallac) and expressed as a mean cpm ± SEM of triplicate cultures.

Flow cytometry. Cell staining for T cell activation markers was performed on PBMCs activated as described during 4 days and using anti-CD69, anti-CD25 (Becton Dickinson) or anti-HLA-DR (Caltag) antibodies. Cell sorting was performed after 4 days of stimulation with 1 µg/ml anti-CD3 and 20 U/ml IL-2, using PBMCs stained with annexin V (AV)-FITC (Biosdesign, Kennebunk, ME, USA). Living (AV⁻) and dying or dead cells (AV⁺) were sorted using a FACStar[®] (Becton-Dickinson, Mississauga, ON, Canada) after gating on lymphocytes on the basis of Forward/Side scatter. Purified lymphocyte subsets from treated PBMCs were obtained by cell sorting after staining with anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19 (Becton Dickinson), or anti-CD45RO and anti-CD45RA (Serotec)

antibodies. For T cell subset sorting, dead cells were gated out on the basis of Forward/Side scatter and the purity of sorted T cell subsets was greater than 99%. For each sample, 10^4 events were collected using the FACScan[®] flow cytometer.

Staining for *in vivo* caspase activity was performed using the cell permeable substrate Phiphilux-G₁D₂ (Oncoimmunin Inc., College Park, MD, USA) containing the consensus sequence DEVDG. Briefly, resting or activated cells were washed, incubated with the substrate (10 μ M final) for 1 h at 37°C followed by another wash with the dilution buffer, according to the manufacturer's instructions. Fluorescence was monitored using the FL1 detector of an EPICS[®] XL flow cytometer (Coulter) and gates were set on living and either resting or blastic cells before analysis. For each sample, 3×10^4 events were collected.

Western blotting. Treated cells were washed with PBS, and pellets were resuspended in sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8; 6 M urea; 10 % glycerol; 2 % SDS; 0.00125 % bromophenol; 5 % 2-mercaptoethanol) and boiled for 3 min. Proteins from 5×10^5 to 10^6 cells were separated on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (Hybond C Super, Amersham, Oakville, Canada). Blots were blocked for 1 hr at room temperature in PBS 0.05% Tween, containing 5 % of non-fat dried milk, washed and incubated with the different antibodies. Detection was achieved with the appropriate secondary antibodies coupled to Horseradish peroxydase, followed by enhanced chemiluminescence ECL Western blotting kit (NEN) and visualized by autoradiography.

Immunoprecipitation and affinity Blot. Proteins from PBMCs (5×10^6 cells) stimulated with 1 μ g/ml PHA and 20 U/ml IL-2 during 4 days were extracted in lysis buffer (2% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 50 mM tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM NaH₂PO₄, 2 mM EGTA, 10 mM EDTA, 0.5 mM, Na₃VO₄). Cell lysates were incubated with 5 μ M of biotinylated zVAD-fmk and subjected or not to immunoprecipitation using the caspase-3 anti-serum. Protein G-sepharose coupled beads (Pharmacia) were pre-incubated for 30 min at 4°C with 10 μ l of anti-caspase-3 antiserum. After 3 washes with lysis buffer, the beads were added to total cell lysates for a 2h incubation at 4°C with gentle agitation. The beads were then washed 3 times with LB and boiled for 5 min in 50 μ l of Laemmli buffer. Whole cell lysates or immunoprecipitated proteins were loaded on polyacrylamide gels for electrophoresis and transferred to high bond C membranes. Blots were blocked overnight at 4°C with PBS Tween 0.05% supplemented with BSA (3%) and non-fat dry milk (2%) and revealed after incubation with Extravidin conjugated-peroxydase (1:2000; SIGMA) for 1h at room temperature for affinity blot or with anti-caspase-3 antiserum for western blot as described above.

Fas treatment. Jurkat cells or PBMCs stimulated during 4 days with anti-CD3 antibody and IL-2 were incubated at 10^6 cells/well in 24-well plates coated or not with anti-Fas (M3) monoclonal antibody. Coating was performed for 2h at 37°C using 20 µg/ml of antibody in 0.05M Tris pH 9.3. After 4 h (Jurkat cells) or 6 h (PBMCs) of incubation on coated plates, cells were washed with PBS and the pellet was kept at -80°C until western blot analysis. An aliquot of stimulated cells was used for Annexin V staining as described previously¹¹.

Legends

Figure 1. The general caspase inhibitor zVAD blocks anti-CD3-induced T cell activation. **(A)** Inhibition of PBMCs proliferation by zVAD. Purified PBMCs were cultured in medium alone (NS) or stimulated with 1 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 and 20 U/ml IL-2 (CD3) in the presence of the indicated concentration of zVAD. At each time point, 1 $\mu\text{Ci/well}$ of [^3H]-thymidine was added for the last 6 h of culture, cells were harvested and incorporated thymidine was counted by liquid scintillation. [^3H]-thymidine incorporation is expressed as a mean cpm \pm SEM of triplicate cultures. Results are representative of 3 experiments where full kinetics was carried out. **(B)** zVAD does not inhibit cell cycle machinery. Fresh PBMCs were placed in RPMI medium and 100 μM of zVAD was added 1h before or 1, 2 or 3 days after stimulation in the presence of anti-CD3 antibody and IL-2. Cells were cultured during 4 days at 37°C and [^3H]-thymidine was added for the last 6h of incubation. Thymidine incorporation at day 4 is expressed as cpm \pm SEM from triplicate cultures. Two independent experiments gave similar results. **(C)** Inhibition of blastic transformation by zVAD. Change in PBMCs morphology was monitored by flow cytometric analysis of cellular forward (Y axis) and side (X axis) scatter. Percentage of resting PBMCs (region R1) are indicated inside dot plots. One representative experiment out of five is shown. **(D)** zVAD affects the expression of MHC class II. Surface staining was performed for CD69, HLA-DR and CD25 on PBMCs activated during 4 days with anti-CD3/IL-2, in the presence or absence of 100 μM of zVAD. One representative experiment of three is shown. **(E)** The effect of zVAD is independent of accessory cells. Purified T lymphocytes isolated from PBMCs by negative selection were preincubated for 1h in medium alone or with 100 μM zVAD and cultured during 4 days without stimulation (NS) or in the presence of IL-2, anti-CD3, or both. Proliferation was assessed by [^3H]-thymidine incorporation as described for panel (A). Results are representative of two independent experiments.

Figure 2. Caspase-3 is cleaved into multiple fragments in stimulated lymphocytes. **(A)** Proliferation. Purified PBMCs were obtained through Ficoll gradient separation and stimulated with 1 $\mu\text{g/ml}$ of anti-CD3 and 20 U/ml of IL-2 (Anti-CD3) or not (Medium). After 1 to 4 days at 37°C, thymidine incorporation was determined as in Fig. 1. **(B)** Caspase-3 western blot. Proteins were extracted from the same PBMCs treated in panel (A) by cell lysis using a denaturing Laemli buffer containing 8 M urea. Total proteins extracted from 10^6 fresh (d0), unstimulated (-) or stimulated cells (+), were separated on SDS-PAGE and western blot analysis was performed using a polyclonal rabbit anti-caspase-3 (5). **(C)** Detection of active caspases by affinity blot. PBMCs stimulated or not for 4 days with anti-CD3, anti-TCR or PHA in the presence of IL-2 were lysed using a non-denaturing lysis buffer

(see Experimental procedures) and lysates were incubated with 5 μ M of a biotinylated-zVAD-fmk peptide, followed by a separation by SDS-PAGE and western blot analysis using Extravidin-HRP. **(D)** Identification of active subunits of caspase-3. PBMCs were activated during 4 days with PHA and IL-2 and cell lysates were incubated with the substrate. Caspase-3 immunoprecipitation was then performed on half of the lysate. Total extract (Lys) or immunoprecipitated caspase-3 (IP) were subjected to western blot analysis using the anti-caspase-3 antibody (left panel) or with Extravidin-HRP (right panel). Results are from one of at least 3 independent experiments giving similar results. **(E)** Detection of caspase activity in intact cells. Fresh PBMCs were left untreated (NS) or stimulated (CD3/IL-2) with anti-CD3 antibody and IL-2 for 4 days. A fraction of these activated cells was then incubated for 6h in anti-Fas-coated plates (CD3/Fas). Following a 1 h labeling with the cell permeable substrate Phiphilux, the cells were analyzed by flow cytometry. Results are from one representative experiment out of three.

Figure 3. Caspase-3 activation occurs in various lymphocyte subsets. (A) and **(B)** Caspase cleavage is detected in CD4⁺, CD8⁺, CD45RO⁺ or CD45RA⁺ lymphocytes. PBMCs were stimulated (+) or not (-) with anti-CD3 and IL-2 for 4 days at 37°C and stained for CD4, CD8, CD45RO, or CD45RA expression. Each subset was sorted by flow cytometry after gating on living cells on the basis of Forward/Side scatter. The purity of sorted cells was greater than 99%. Total population (Tot) or sorted cells were then lysed as in Figure 3 and subjected to western blot analysis for caspase-3 processing. **(C)** Caspase-3 is cleaved following B cell receptor triggering. Fresh PBMCs (To) were cultured with medium alone (NS), anti-CD3 and IL-2 (CD3), or SAC during 4 days and whole PBMCs (lane 1-3) or sorted CD19⁺ B lymphocytes (lane 4) were lysed in Laemli buffer and subjected to western blot analysis using the anti-caspase-3 antibody. Following cell sorting, viability was greater than 95 % as assessed by trypan blue exclusion. These results are representative of four (panel A and B) and two (panel C) independent experiments with PBMCs from different individuals.

Figure 4. Selective downstream caspase processing in activated lymphocytes. (A) Caspase-6 and -7 are also processed following TCR triggering. PBMCs were stimulated (+) or not (-) with anti-CD3 antibody and IL-2 for 1 to 4 days and total proteins from 10⁶ cells were separated by SDS-PAGE and analyzed by western blot using anti-caspase-6 or -7 antisera. The proenzyme and cleaved subunits are indicated on the right by arrows. **(B)** All caspases are not processed in activated cells. Day 4 unstimulated (-) or anti-CD3/IL-2 stimulated (+) PBMCs were

analyzed for caspase-1, -2 or -4 processing by western blot as described in panel (A).

Figure 5. Caspase-8 is cleaved in activated lymphocytes whereas caspase-9 remains as a proenzyme. (A) Caspase-8 is processed in proliferating cells. PBMCs were stimulated (+) or not (-) with anti-CD3 antibody and IL-2 for 1 to 4 days and total proteins from 10^6 cells were analyzed by western blot using an anti-caspase-8 antiserum. The proenzyme and cleaved subunits are indicated on the right by arrows. **(B)** Caspase-8, but not caspase-9 is activated early after T cell stimulation. Fresh (0) or anti-CD3-stimulated PBMCs (1 to 48h) were lysed and 10 μ g of proteins from each sample were separated by SDS-PAGE and analyzed for caspase-3, -8, and -9 processing by western blot as described above. Results are representative of two independent experiments.

Figure 6. Caspase activation results in selective substrate cleavage. Total proteins from 10^6 unstimulated (-) or anti-CD3 activated (+) PBMCs were obtained at different time points (day 1 to day 4), separated by SDS-PAGE and analyzed by western blot using an anti-PARP, DFF45 or caspase-3 anti-serum, or an anti-Wee1 monoclonal antibody. As a control for caspase-mediated cleavage, total proteins from 10^6 Jurkat cells cultured on uncoated or anti-Fas-coated plates (M3: 20 μ g/ml) during 4 hours were subjected to the same treatment than for PBMCs and results are shown on the right. The 45 kD strong band observed with the anti-Wee1 antibody throughout the kinetic results from a cross-reactivity observed in some tissues with this antibody, according to the manufacturer. These experiments were performed three times and gave similar results with different PBMCs donors.

Figure 7. Substrate processing during T cell activation is caspase-dependent and is different than following apoptosis. (A) Substrate cleavage is caspase-dependent. Fresh PBMCs were stimulated during 48 h with anti-CD3 and IL-2 in the presence or the absence of 100 μ M of zVAD. An aliquot was conserved for quantitation of DNA synthesis by thymidine experiments and cells were lysed in denaturing buffer for western blot analysis of PARP, Wee1, Lamin B and Caspase-3 cleavage. Black arrows indicate the full length proteins while white arrows designate the cleaved forms. **(B)** DFF cleavage is detected only after apoptosis induction. PBMCs activated for 4 days with anti-CD3 and IL-2 were placed in anti-Fas-coated plates and cultured for 6 h at 37°C. Apoptosis was assessed by Annexin V/PI staining and the cells were subjected to western blot analysis using the DFF45 antiserum. Results are from one representative experiment out of three.

Figure 8. Caspase and substrate cleavage occur in non-apoptotic cells. (A) Caspase-3 and PARP processing are detected in Annexin V negative cells. PBMCs were

stimulated (+) or not (-) with anti-CD3 antibody and IL-2 during 4 days and stained for 10 min with FITC-conjugated Annexin V (AV). Living (AV-) and dying (AV+) activated lymphocytes were purified by flow cytometric cell sorting. Proteins from sorted cells were subjected to western blot analysis for caspase-3 and PARP. Both antibodies were used on the same membrane. One representative experiment of three is shown. **(B)** Caspase-6 and -7 and the caspase substrates are processed in viable sorted cells. Unstimulated and unsorted PBMCs (lane 1) or activated and AV⁻ sorted cells (lane 2) were lysed in Laemli buffer. Proteins from 5×10^5 cells were analyzed by western blot for PARP, DFF45, Wee1, caspase-6, or caspase-7 processing using the appropriate antisera. Arrows on the right indicate the full length form of each protein. Results are representative of two independent experiments.

Figure annexe. L'activation des caspases suite à la ligation du TCR résulte de la co-stimulation des cellules T via TNFR. (A) Des triplicatas de lymphocytes T primaires enrichis à 95% ont fait l'objet d'une activation via le récepteur TCR/CD3 à l'aide d'un anticorps anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) immobilisé au fond des puits et ce en présence ou en absence du récepteur neutralisant TNFR-Fc (60 $\mu\text{g/ml}$). Après 2 jours de stimulation la prolifération des cellules a été évaluée à l'aide du test d'incorporation de la ^3H -thymidine. **(B)** la viabilité des cellules provenant des conditions décrites en (A) a été évaluée par double marquage AnV/PI et analysée à l'aide de cytométrie en flux (FACs). **(C)** Les lysats cellulaires issus des conditions présentées en (A) ont servi à l'analyse de l'état d'activation de caspase-3 par western blot.

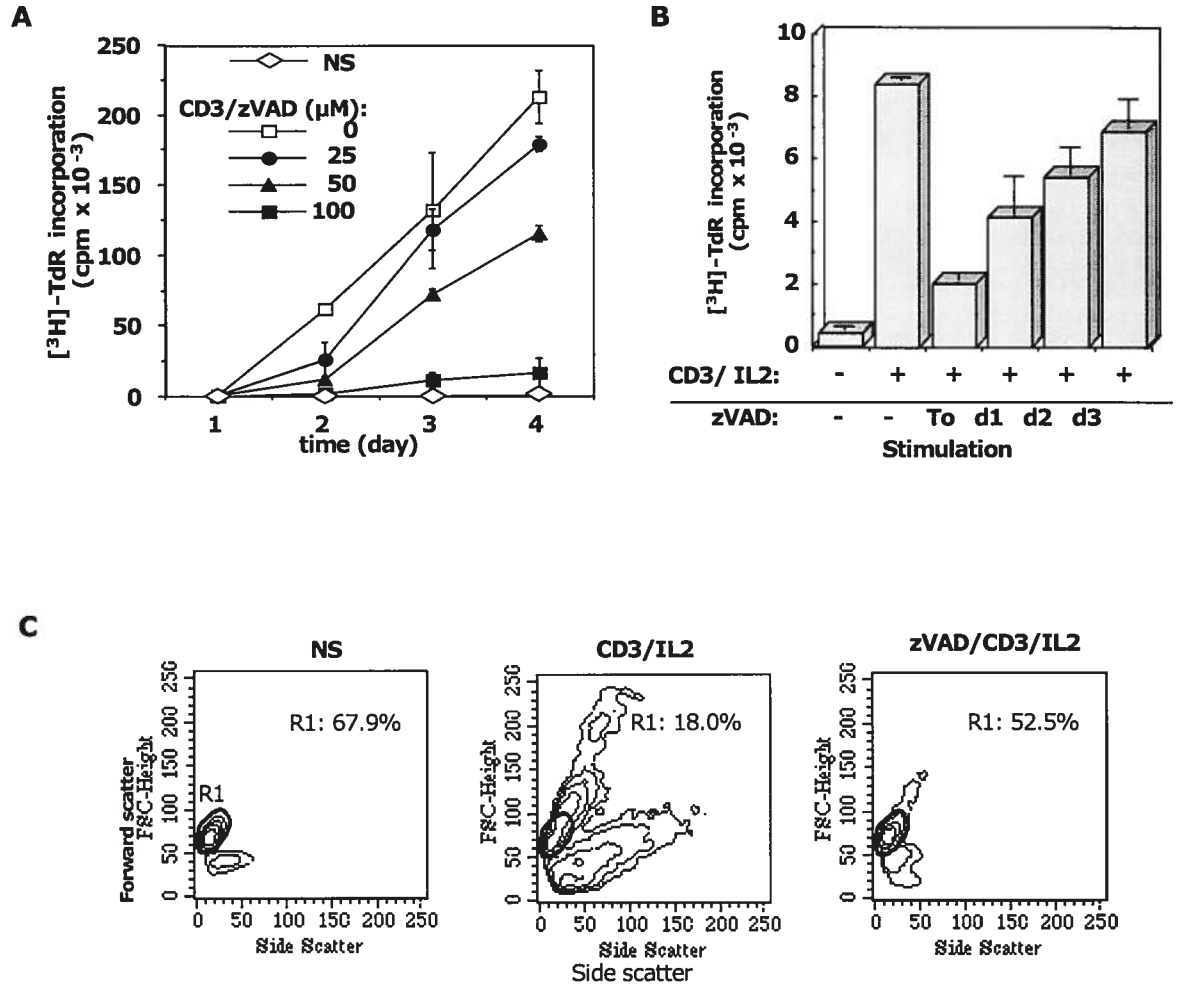


Figure 1

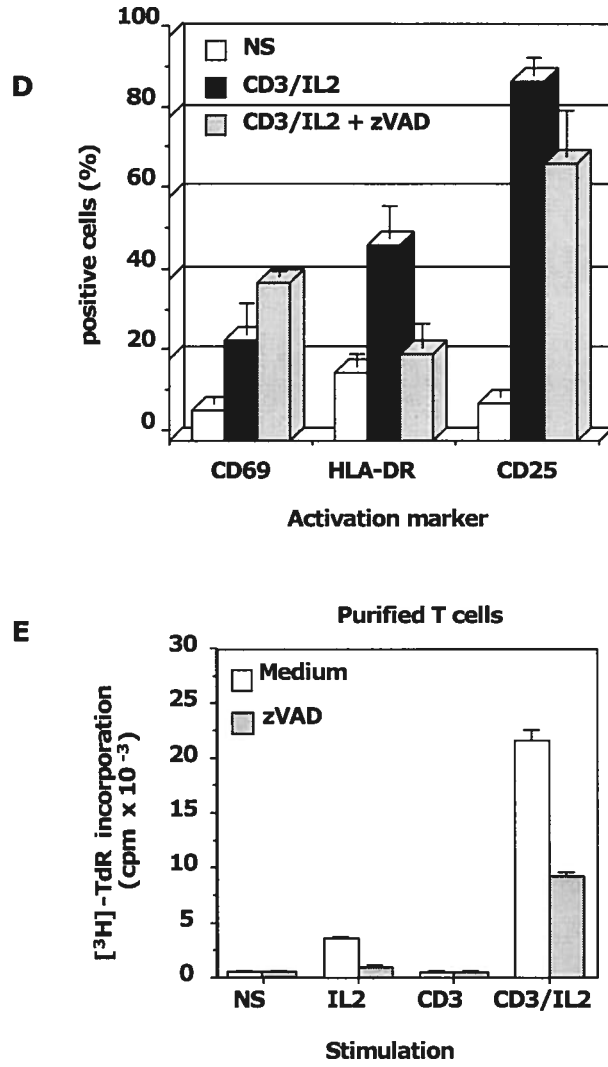


Figure 1

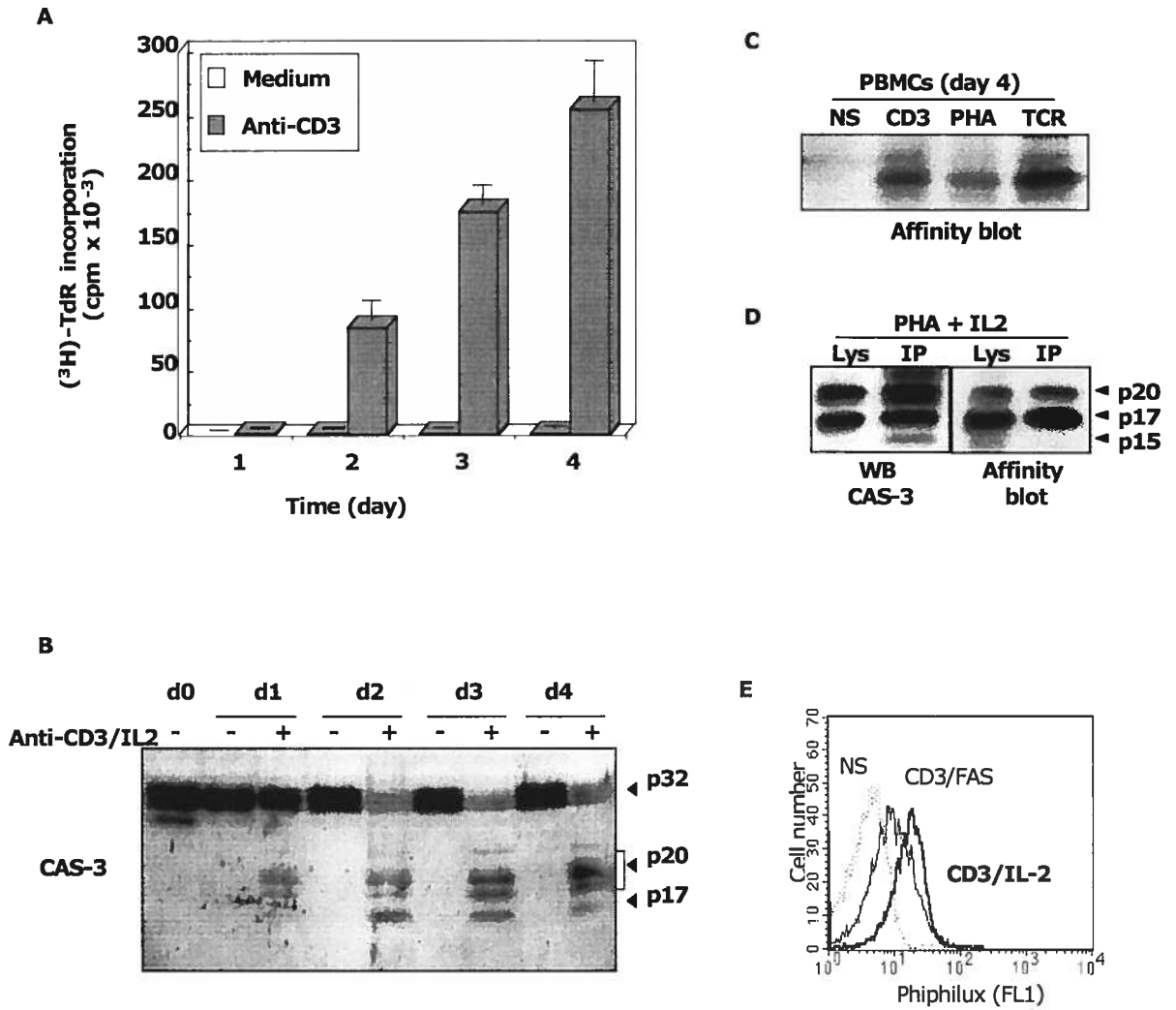


Figure 2

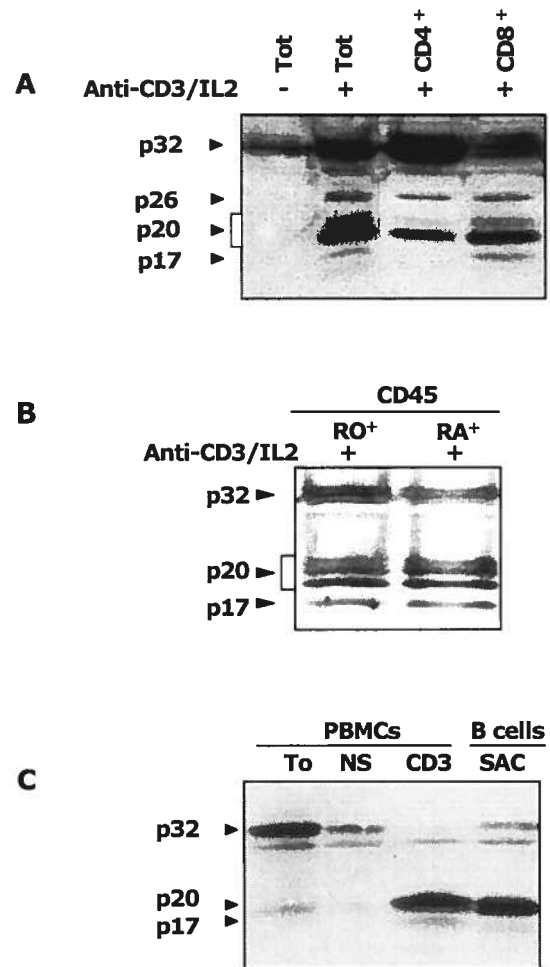


Figure 3

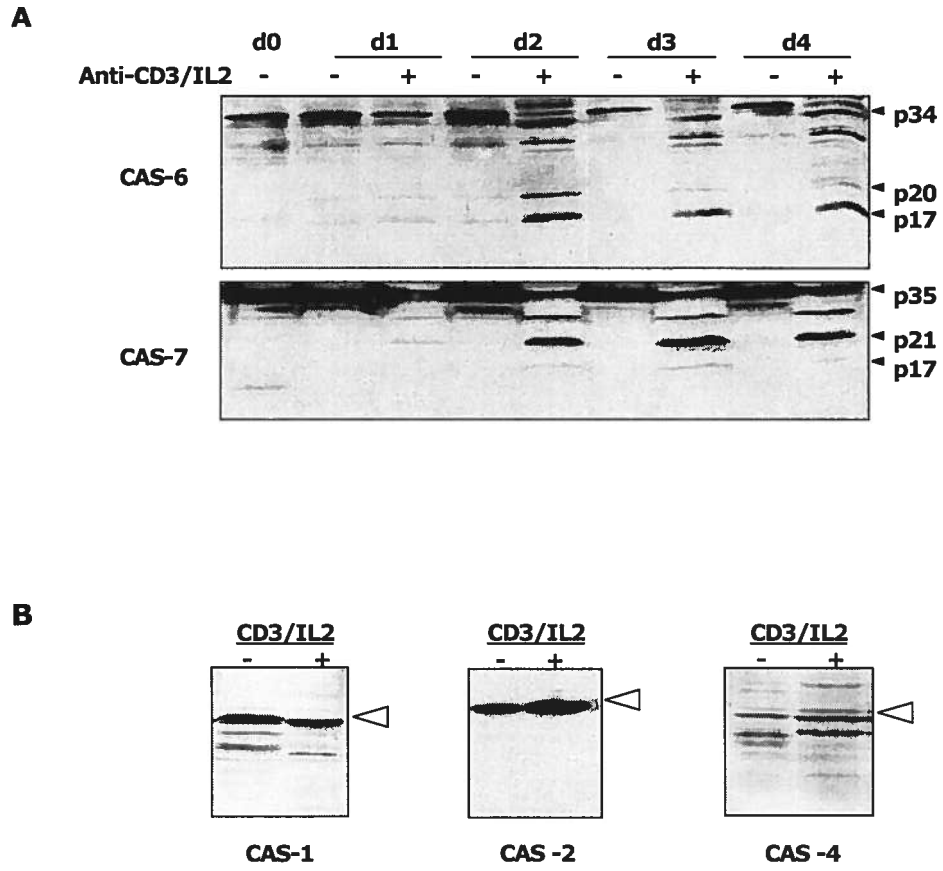


Figure 4

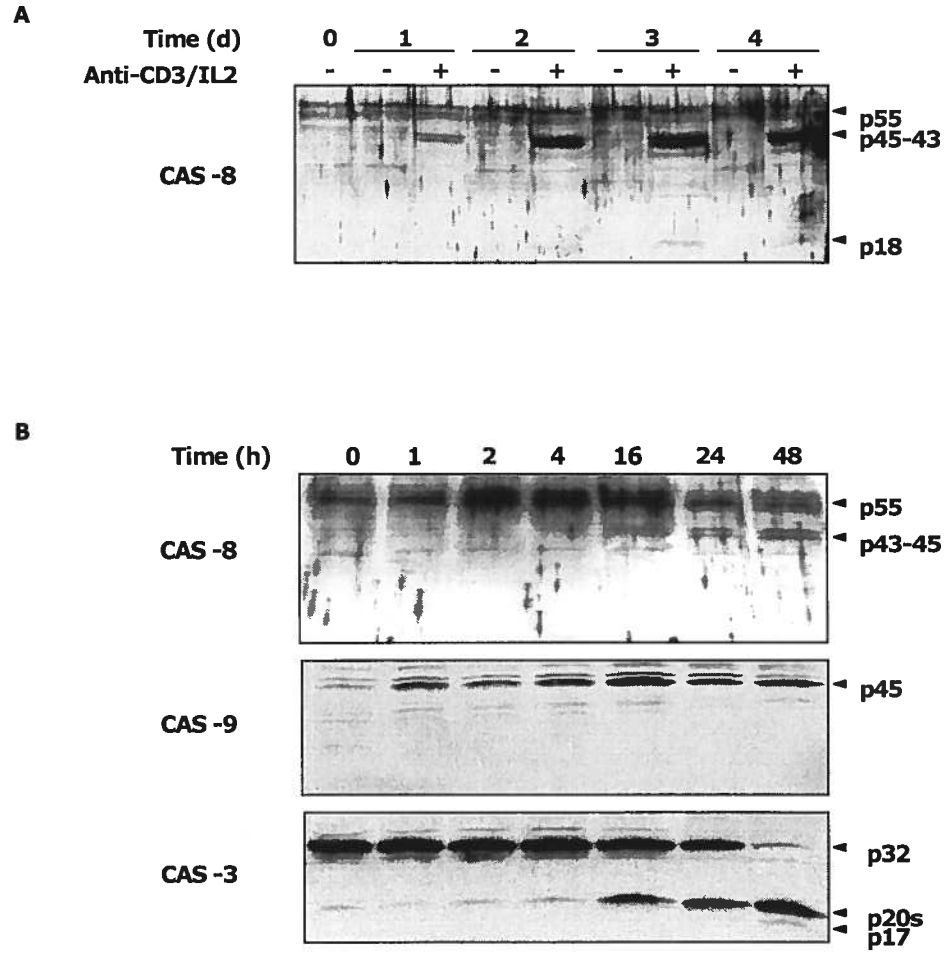


Figure 5

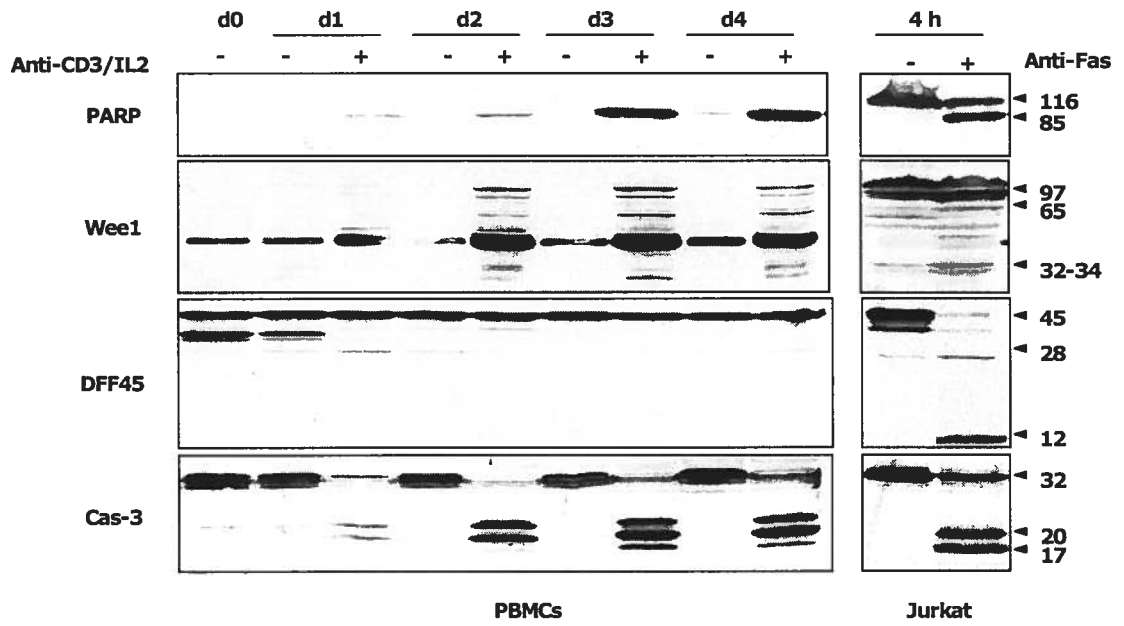


Figure 6

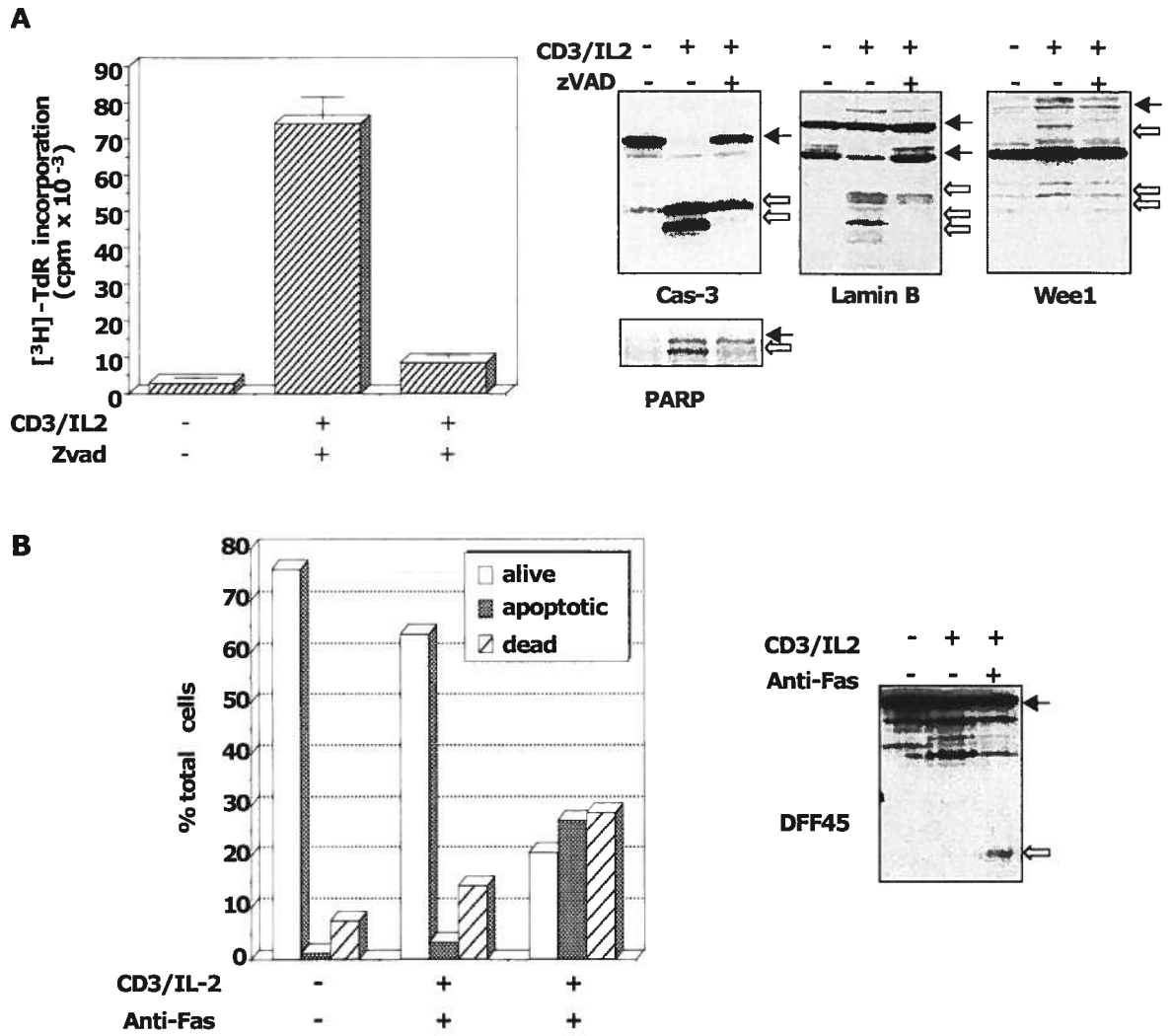


Figure 7

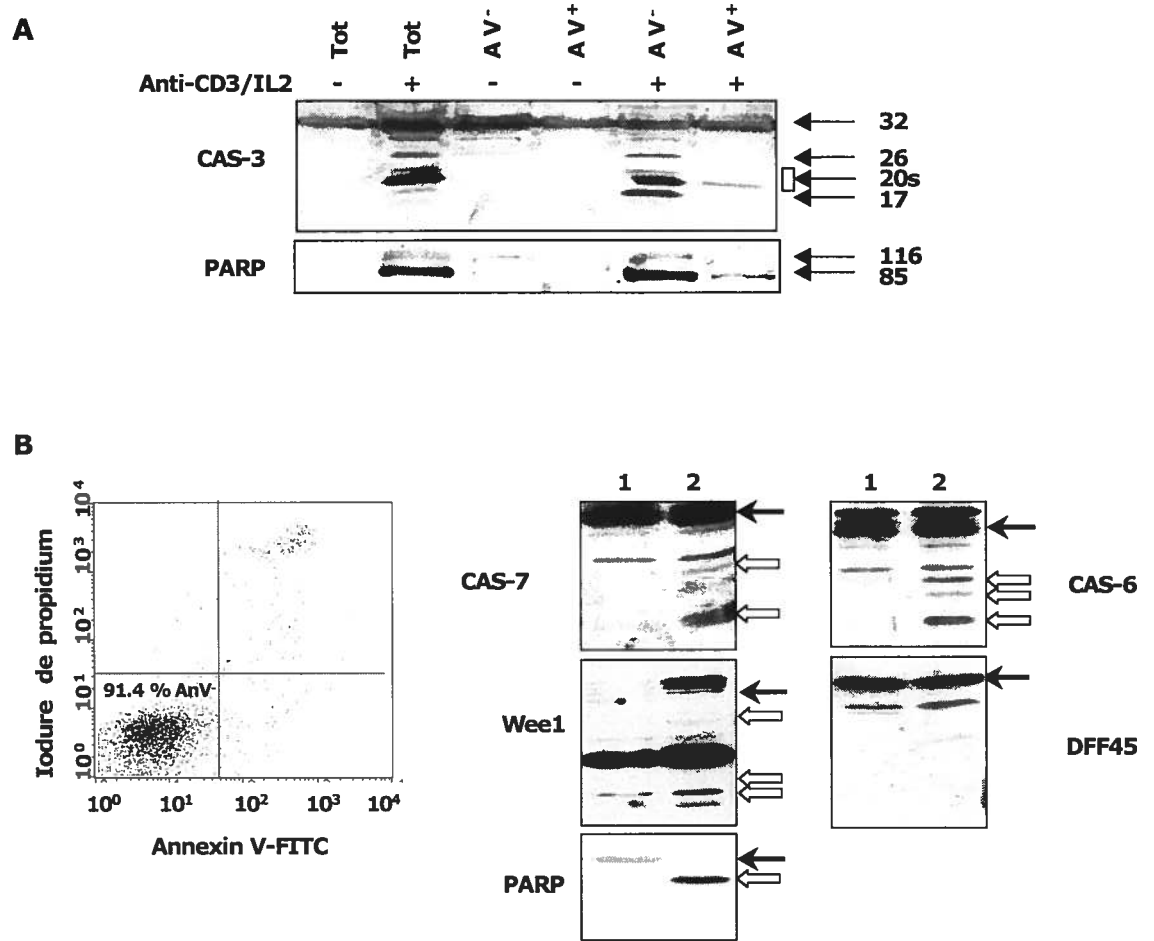


Figure 8

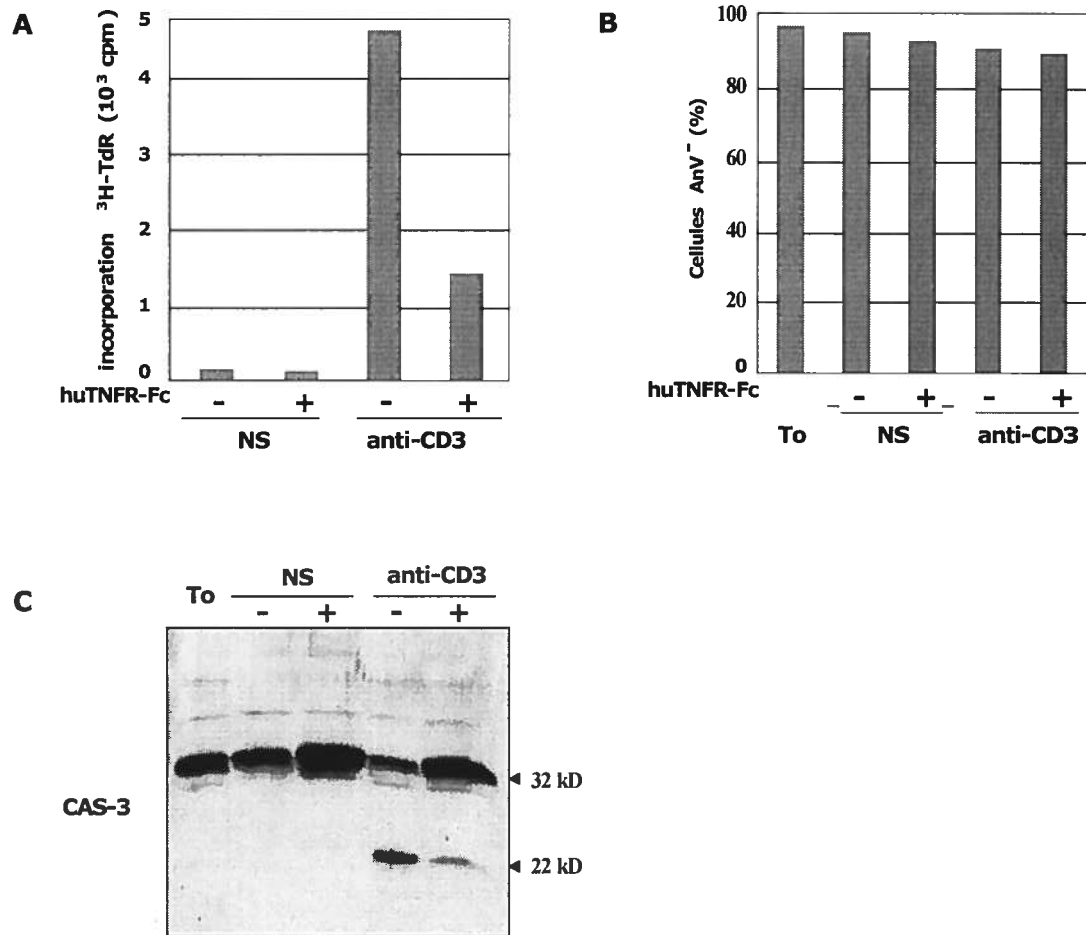


Figure annexe

Deuxième chapitre

Résumé

La transmission des signaux de mort provenant de la réticulation des récepteurs de mort tels que Fas peut se faire de deux manières possibles selon le type cellulaire. Dans les cellules du type-I, le complexe de signalisation, DISC, résultant de la ligation de Fas transmet le signal de mort directement aux caspases exécuteurs telles que caspase-3 alors que dans les cellules du type-II la mitochondrie intervient en amont des caspases exécuteurs pour amplifier le faible signal initial provenant du DISC. Indépendamment du type cellulaire le consensus actuel présente caspase-8 comme le seul membre de cette famille de protéases capable de déclencher la cascade protéolytique menant à l'apoptose, ce qui place cette protéase à l'apex des signaux issus de la ligation de Fas.

Les données présentées dans cet article montrent que dans les Jurkats, lignées lymphocytaires T considérées du type-II, la ligation de Fas provoque l'activation de caspase-3 même après le blocage des événements mitochondriaux, ce qui démontre l'intervention de cette caspase en amont et non pas en aval de la mitochondrie comme cela a été suggéré auparavant. Ceci nous a conduit à chercher à quel niveau de la signalisation l'activation de caspase-3 se déclenche et si cette activation participe à l'initiation des signaux provenant de Fas. L'analyse de la distribution sub-cellulaire de cette caspase et d'autres membres de sa famille ainsi que certains éléments de la signalisation de Fas a montré qu'une fraction significative de caspase-3 est localisée dans le compartiment des rafts de la membrane plasmique. De plus, la ligation de Fas provoque l'augmentation de la fraction de caspase-3 associée aux rafts. Cette dynamique particulière d'association de caspase-3 avec les rafts indique l'intervention de cette enzyme dans l'initiation de l'apoptose via Fas. Effectivement, l'analyse de la composition du DISC de Fas a montré que caspase-3 fait partie des molécules associées à ce complexe de signalisation. De plus, l'apport de l'activation de caspase-3 à l'initiation de l'apoptose via Fas a été confirmé par l'inhibition de l'activation de caspase-8 sous l'effet de l'administration d'un dominant négatif de caspase-3. Ceci révèle l'implication de caspase-3 dans l'initiation des signaux d'apoptose provenant de Fas, un événement qui était réservée seulement à caspase-8.

Mots clés: Caspases/DISC/Fas/Mitochondrie/Rafts/Bcl-2

Rapport décrivant ma contribution personnelle à cet article

L'anticorps anti-caspase-8 que j'ai généré au début de ma thèse a servi dans la comparaison des cinétiques d'activation de caspase-3 et caspase-8 résultant de la ligation de Fas dans la lignée Jurkat. Ces essais préliminaires m'ont permis de mettre en évidence l'activation précoce de caspase-3 dans cette voie de mort.

Afin de déterminer l'apport de caspase-3 à l'initiation du signal apoptotique via Fas, mon directeur de thèse et moi-même avons décidé d'étudier l'impact de l'inhibition de cette caspase sur l'activation de caspase-8 et l'exécution de l'apoptose induite via Fas. C'est pour cette raison que j'ai généré avec l'aide de mon collègue, Antoine Alam, la chimère TAT-Cas3c/s qui a servi de dominant négatif de caspase-3.

L'observation concernant la précocité de l'activation de caspase-3 m'a semblée contradictoire avec le modèle courant du type-II, qui positionne la mitochondrie en amont de caspase-3. Ceci m'a mené à étudier l'effet du blocage de la mitochondrie sur l'activation de caspase-3. J'ai profité de la lignée Jurkat surexprimant Bcl-2, JIB2 développée par Luchino Cohen, pour adresser ce point. L'utilisation de cette lignée a montré que l'activation de caspase-3 induite par la ligation de Fas survient même dans la lignée JIB2 démontrant ainsi la précocité de l'activation de cette caspase dans cette voie de mort.

L'analyse biochimique des préparations membranaires provenant de la lignée Jurkat et des cellules T primaires a démontré l'association constitutive de caspase-3 avec les rafts. Ehsan Sharif Askari, a effectué l'analyse, par western blot, de l'association de caspase-3 et Lck avec les rafts provenant des lymphocytes T primaires.

L'association de caspase-3 avec les rafts et son activation en amont de la mitochondrie suggèrent une implication de cette caspase dans l'initiation des signaux issus de Fas. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai entrepris d'examiner l'association de cette caspase avec le site d'initiation des signaux de Fas, le DISC.

La contribution de Elias Haddad réside dans sa participation active à la rédaction de ce manuscrit et aux critiques pertinentes qui ont renforcé la qualité de ce dernier.

**Caspase-3 is a Component of Fas DISC in Lipid Rafts and its Activity is
Required for Complete Caspase-8 Activation During
Fas-mediated Cell Death**

Salah M. Aouad^{1,2}, Luchino Y. Cohen¹, Ehsan Sharif-Askari^{1,3}, Elias K. Haddad^{1,3}, Antoine Alam¹, and Rafick-Pierre Sekaly^{1,3,4}

Accepted for publication in The Journal of Immunology. December 2003

¹Laboratoire d'immunologie, Département de Microbiologie et d'Immunologie, Université de Montréal, Montréal, H3C 3J7, Canada. ²Programme de biologie moléculaire, Université de Montréal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada. ³Department of Microbiology and Immunology, and, ⁴Department of Experimental Medicine, McGill University, Montréal, H3A 2B4, Canada.

Abstract

Since its discovery, caspase-8 has been placed at the apex of the proteolytic cascade triggered by death receptors (DR) cross-linking. Because of its capacity to interact with the cytoplasmic portion of DR, it has been suggested that caspase-8 acts independently of other caspases in the initiation of Fas and other DR signaling. In this study, we demonstrate that in Jurkat cells, caspase-3 cleavage is an early step during Fas-induced apoptosis. We show that caspase-3 processing into its p20 occurs rapidly after Fas cross-linking, in the absence of mitochondrial depolarization and caspase-9 activation. Moreover, caspase-3 is present in lipid rafts of untreated Jurkat cells and peripheral T lymphocytes. Caspase-3, caspase-8 and FADD are further recruited to lipid rafts of Jurkat cells following anti-Fas treatment. Fas immunoprecipitation reveals that caspase-3 is a component of the death-inducing signaling complex (DISC), suggesting that this cysteine protease is in close proximity to caspase-8. Furthermore, transduction of Jurkat cells with a caspase-3 dominant-negative form inhibits caspase-8 processing and results in inhibition of apoptosis suggesting that caspase-3 activity is required for caspase-8 activation. Overall, these findings support a model whereby caspase-3 is a component of the DISC located in lipid rafts and as such, is involved in the amplification of caspase-8 activity by the mitochondrion.

Keywords: T lymphocytes, Cell surface molecules, Apoptosis.

Introduction

Apoptosis or programmed cell death plays a fundamental role in the development and homeostasis of the immune system. Alteration of the apoptotic machinery in peripheral T lymphocytes leads to abnormal T cell homeostasis and the development of auto-immune diseases in human and mice¹. DR are TNF receptor (TNFR) family members such as TNFR-I, Fas (CD95/APO-1), DR3, DR4 and DR5 that harbor a death domain (DD) on their intracellular portion^{2;3} and are potent inducers of apoptosis. Ligation of these receptors with their respective ligands or agonistic antibodies leads to apoptosis through the activation of proteases of the caspase family^{4;5}. These cysteine proteases trigger the apoptotic response by cleaving many substrates after aspartic acid residues. So far, fourteen members have been identified within the caspase family⁶⁻⁸. Cells from mice deficient in some caspases or expressing viral caspase inhibitors, such as the cytokine response modifier A (CrmA) or p35, are resistant to apoptosis mediated by DR confirming the requirements of these cysteine proteases in DR-mediated apoptosis⁹⁻¹³.

Fas ligation leads to caspase activation via the Fas-associated death domain (FADD) protein, an adaptor molecule that recruits caspase-8 to Fas since FADD interacts with Fas through its DD and with caspase-8 through a Death Effector Domain (DED). This results in the formation of a death-inducing signaling complex (DISC)¹⁴⁻¹⁷. Recently, it has been reported that Fas engagement on murine thymocytes induces the clustering of this receptor as well as the recruitment of FADD and caspase-8 in the lipid-rich plasma membrane compartments called lipid rafts¹⁸. These plasma membrane structures are highly ordered micro-domains containing sphingolipids, cholesterol, trans-membrane proteins and lipid-anchored proteins¹⁹. They have long been proposed as the host of signal initiation of several immune receptors including the TCR, the B cell receptor and the Fc ϵ receptor I²⁰⁻²³. NF- κ B activation by TNFR_I and Fas-mediated apoptosis in thymocytes are dependent on relocalisation of these DR to lipid rafts²⁴.

Two pathways observed in different cell types have been proposed for subsequent steps of Fas signaling. In type-I cells, the highly efficient recruitment of caspase-8 to the DISC allows this caspase to act directly on downstream caspases such as caspase-3, which is responsible for the cleavage of death substrates and execution of apoptosis²⁵. In type-II cells, recruitment of caspase-8 to the DISC is weak but sufficient to trigger mitochondrial events through processing of the pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bid^{26;27}. These events culminate in the release of cytochrome c in the cytosol, the formation of the apoptosome, a multimeric catalytic complex consisting of cytochrome c, Apaf-1 and caspase-9 that serves to amplify the weak

initiating signal resulting from the altered DISC²⁸ and the release of Smac/Diablo, which antagonizes XIAP-mediated caspase-3 inhibition²⁹. Regardless of the cell type, caspase-8 is still considered to act independently of other caspases in the initiation phase of Fas-induced apoptosis. The poor recruitment of caspase-8 to the DISC in type II cells prompted us to dissect events that occur prior to Fas-mediated mitochondrial alteration and to seek the contribution of another major caspase, caspase-3, to Fas signaling. Our results reveal that this caspase is a component of the DISC along with caspase-8, that caspase-3 co-localizes in lipid rafts with caspase-8 and that caspase-3 activity is required for complete caspase-8 activation following Fas cross-linking.

Results

Caspase-3 cleavage is triggered independently of mitochondrion in Fas-mediated apoptosis

A Bcl-2-inducible expression system in Jurkat cells under the control of doxycyclin (DOX) was generated in order to determine whether the cleavage of caspase-3 occurs prior to or following mitochondrial events during Fas-induced apoptosis. Bcl-2 negative (-DOX) or Bcl-2-expressing Jurkat cells (+DOX) were subjected to anti-Fas treatment and apoptosis levels, MTP loss and caspase activation were analyzed using Annexin-V (AnV) assay, DiOC₆ staining and western blotting, respectively. Four hours after Fas cross-linking, up to 70 % of Bcl-2 negative cells underwent apoptosis while only 13 % of DOX treated cells displayed signs of apoptosis (Figure 1A). In Bcl-2 expressing cells, anti-Fas treatment did not trigger a decrease in DiOC₆ incorporation (Figure 1B), confirming the inhibitory effect of Bcl-2 on the mitochondrial response to Fas ligation. In the presence of Bcl-2, procaspase-9 and PARP degradation in response to Fas cross-linking were totally inhibited and caspase-8 cleavage was almost abrogated (Figure 1C). However, in three independent experiments, generation of the caspase-3 p20 cleavage product still occurred following treatment with anti-Fas (Figure 1C). Therefore, a first cleavage step between the large and small subunits of caspase-3 occurs in the absence of mitochondrial events indicating that caspase-3 processing into p20 is triggered either independently or upstream of the mitochondrial cytochrome c release. In contrast, removal of the prodomain of caspase-3, complete processing of caspase-8 and progression to cell death are fully dependent on mitochondrial events.

Caspase-3 is present in lipid rafts before Fas engagement

Cleavage of caspase-3 in the presence of Bcl-2 suggested that it occurred upstream of the mitochondria and possibly at the plasma membrane. Therefore, we explored the possibility of association of caspases-3, caspase-8 and other apoptotic components with the plasma membrane, particularly lipid rafts. Lipid rafts were purified from lysates of untreated Jurkat cells by ultracentrifugation on a sucrose gradient^{19;30}. Figure 2A shows the distribution of GM-1, a well-established raft-associated molecule³¹ in fractions obtained from Jurkat cell extracts. Sucrose fractions 4 to 7 were positive for GM-1 and hence contained proteins from lipid rafts. Surprisingly, caspase-3 and caspase-7 were reproducibly (n=3) detected in the same fractions, indicating that a proportion of the caspase-3 and -7 intracellular pools is constitutively located at the membrane level in lipid rafts, even in the absence of Fas engagement (Figure 2B). Caspase-8, FLIP_L and FADD were also found in these raft-rich

fractions, before Fas cross-linking. Localization of these molecules in lipid-rich compartment was specific since caspase-9 was not found in GM-1-positive fractions (Figure 2B). Furthermore, Lamin B, a protein exclusively found in the nucleus did not co-localize with caspase-3, 7 and 8, confirming that localization of these caspases in lipid raft fractions did not result from a contamination by non-raft fractions (fractions 10 and 11) during the process of extraction. Lipid rafts were extracted from peripheral blood T cells to determine whether the localization of caspase-3 in lipid rafts could be observed in a more physiological system. Caspase-3 was found as a constituent of lipid rafts along with the well-known raft-associated molecule p56^{lck} in untreated, non-apoptotic peripheral lymphocytes (Figure 2C and 2D). Caspase-3 localization in these signaling platforms persisted during at least 16 h of stimulation with an anti-CD3 antibody. These data demonstrate that effector caspases are localized in lipid rafts in the absence of Fas cross-linking and that caspase-3 co-localizes with p56^{lck} in lipid rafts of normal peripheral T lymphocytes.

Fas engagement increases caspase-3 levels in lipid rafts

Upon receptor engagement, redistribution of signaling molecules between raft and non-raft compartments is indicative of the involvement of these molecules in early steps of receptor's signal transduction. Hence, we examined the impact of Fas cross-linking on caspase-3 distribution in lipid rafts of Jurkat cells. Results shown in figure 3B consistently showed in three independent experiments that caspase-3 was localized in lipid rafts of untreated cells and that 7 min following Fas ligation, increased levels of caspase-3 were associated to these domains. Fas cross-linking also resulted in a strong increase in caspase-8 and FADD levels in the fractions corresponding to lipid rafts (Figure 3B). On the contrary, CD45 was not recruited to these fractions either before or after Fas cross-linking (Figure 3A). Therefore, Fas-induced recruitment of caspase-3 to lipid rafts, which are well established signaling platforms, suggest that this caspase plays a role in Fas signaling at the plasma membrane level.

Caspase-3 is an integral component of the Fas death-inducing signaling complex (DISC)

Since caspase-3 was found in lipid rafts where the DISC is formed, the presence of this protease in the DISC following Fas aggregation was investigated. Jurkat cells were subjected to a time course treatment with anti-Fas antibody, lysed in a mild lysis buffer and cell surface cross-linked Fas was further isolated by immunoprecipitation. Interestingly, in two independent experiments caspase-3 was detected in immune complexes of untreated cells (time 0 in Figure 4), supporting the constitutive

localization of this caspase in proximity to Fas and its signaling elements (Figure 4). Caspase-3 levels in the DISC gradually increased upon Fas cross-linking with a peak at 20 min post-ligation. Constitutive association and further recruitment to the DISC was specific to caspase-3 since a protein endowed with a cytoplasmic distribution such as NF- κ B (p65) was not detected in the DISC at any time-point during the kinetic (Figure 4). The increase in FADD levels but not NF- κ B confirms that only proteins from the DISC were immunoprecipitated. Furthermore, the absence of FADD in the immunoprecipitated DISC before Fas cross-linking (time 0) excludes the possibility of a contamination by cytoplasmic proteins at this time-point. Together with data from figures 2 and 3, these results demonstrate that caspase-3 is associated to Fas DISC at the plasma membrane.

Processing of caspase-3 is an early event in Fas-induced apoptosis in Jurkat T cells

The localization of caspase-3 in lipid rafts and its association with elements of the DISC suggest that this caspase is mobilized in the early steps of Fas signaling. In order to verify this hypothesis, we analyzed the activation status of caspase-3 and caspase-8 in response to Fas ligation on Jurkat T cells. The 20 kDa cleavage product (p20) of caspase-3 was detected in lysates from Jurkat cells 60 min following Fas cross-linking, even before phosphatidylserine expression (Figure 5A and B). At this time point, two caspase-3 substrates, DFF and PARP were already partially cleaved. Caspase-8 p45, p43 and p18 cleavage products appeared only 120 min after anti-Fas treatment. To further confirm this early processing of caspase-3, Jurkat cells were treated with anti-Fas antibody for 2 hours and AnV⁻ (viable) or AnV⁺ (apoptotic) cells were sorted by flow cytometry. Results shown in Figure 5C clearly demonstrate that caspase-3 processing into p20 occurs in Fas-treated viable cells (AnV⁻) whereas caspase-8 cleavage was only observed in AnV⁺ apoptotic cells. These results demonstrate that the processing of caspase-3 into its p20 form precedes caspase-8 detectable cleavage during Fas-induced apoptosis, which corroborates the previous observation that caspase-3 (but not caspase-8) cleavage still occurs in the presence of Bcl-2 in anti-Fas-treated Jurkat cells (Figure 1).

Role of caspase-3 activity in caspase-8 processing resulting from Fas ligation

The strong inhibition of caspase-8, but not caspase-3 processing by Bcl-2 prompted us to analyze the effect of caspase-3 inhibition on Fas-induced caspase-8 activation. We took advantage of the widely used protein transduction system using the HIV-1 TAT peptide that has the ability to enter treated cells by passive diffusion

through plasma membrane³². A chimeric protein consisting of the TAT peptide and a catalytically-inactive variant of caspase-3 (TAT-cas3c/s) was used to specifically block caspase-3 activity and study the effect of this inhibition on caspase-8 activation in response to Fas ligation. Figure 6A shows that 100 % of Jurkat cells treated with a FITC-conjugated chimera became FITC positive, demonstrating the high efficiency of the transduction. Pre-treatment of Jurkat cells with TAT-cas3c/s resulted in a 65 % inhibition of apoptosis (Figure 6B) whereas Jurkat cells treated with an irrelevant fusion protein TAT-p16 remained sensitive to Fas-mediated killing (data not shown). Western blot analysis of caspase-8 carried on samples from the same experiment clearly shows that Fas-mediated caspase-8 processing was inhibited by TAT-cas3c/s (Figure 6C). Together with the inhibition of caspase-8 (but not caspase-3) cleavage by Bcl-2, these results demonstrate that caspase-3 activity is essential for complete caspase-8 activation during Fas-induced cell death.

Discussion

Some members of the TNFR family including NGF/p75, CD40, TNFR and Fas are associated with lipid rafts³³⁻³⁵. Experiments performed using murine thymocytes have shown that caspase-8 and FADD are also recruited to lipid rafts following Fas engagement and that disruption of these structures by cholesterol depletion abolishes Fas-triggered DISC formation and cell death³⁶. Furthermore, in a different study, a small amount of caspase-8 and FADD were detected in the DISC before Fas engagement in murine peripheral T lymphocytes³⁷. Our data show that significant amounts of caspase-3, caspase-7, caspase-8 and FADD are associated with rafts before Fas cross-linking in Jurkat cells. Co-precipitation of caspase-3 with Fas also demonstrated that it is a DISC component. These findings are consistent with the presence of pre-assembled Fas trimers at the cell surface, in the absence of Fas-ligand, through domains called pre-ligand assembly domains^{38;39}. The co-localization of caspase-3 and caspase-8 with lipid rafts and the fact that caspase-8 processing was blocked by Bcl-2, whereas caspase-3 cleavage was still partially processed, suggested a role of caspase-3 in the amplification of caspase-8 activation during Fas signaling. Indeed, using a caspase-3 dominant negative form (Figure 6), we have shown that caspase-3 activity is necessary for complete caspase-8 processing, confirming the active participation of caspase-3 in the amplification of Fas-mediated caspase-8 activation. Therefore, this is the first evidence showing the recruitment of an effector caspase to the signaling complex of a death receptor.

The molecular basis for such recruitment is not yet clear since the short prodomain of caspase-3 does not carry the homotypic DED motif found in caspase-8. However, other groups have reported the simultaneous association of caspase-3 and caspase-8 with FLIP⁴⁰, suggesting that this protein might recruit caspase-3 to the DISC. Supporting this hypothesis, we have observed the presence of FLIP_L in lipid rafts of untreated Jurkat cells (Figure 2). FLIP_L is a catalytically inactive caspase-8-like molecule that was initially proposed in several studies to inhibit Fas-mediated apoptosis by interfering with caspase-8 activation following their concomitant recruitment to the DISC^{41;42}. However, it has recently been shown that once recruited to the DISC, FLIP_L is an activator of caspase-8 and can promote apoptosis^{43;44}. Therefore, FLIP_L could exert its pro-apoptotic activity through the recruitment of caspase-3 in the DISC. How a caspase lacking a DED or a CARD homotypic motif such as caspase-3 becomes cleaved into p20 following Fas ligation remains unclear. This activation could be mediated by auto-processing as a consequence of caspase-3 oligomerization in the rafts, in an induced proximity manner as originally proposed for the activation of caspase-8⁴⁵.

Previous reports have suggested that during Fas-mediated apoptosis in type-II cells, caspase-3 activation is triggered downstream of mitochondrial events⁴⁶⁻⁴⁸. This suggested that caspase-3 was only required for the execution of death signals triggered by caspase-8 at the site of initiation. In this study, we show that inhibiting the intrinsic pathway by Bcl-2 overexpression leads to a drastic inhibition of Fas-mediated caspase-8 and caspase-9 activation, but does not prevent caspase-3 from being processed to its p20 form. Our results confirm a previous study also showing the generation of the p20 cleavage product of caspase-3 in Bcl-2 stable transfectants⁴⁹. These results imply that processing of caspase-3 into p20 and p12 is independent of the mitochondrial potential disruption and caspase-9 activity, whereas removal of caspase-3 prodomain (which results in the appearance of the p17), complete caspase-8 activation and execution of apoptosis depend on these events.

It was previously shown that in the presence of Bcl-2, the p20 form of caspase-3 remained associated to XIAP, since Bcl-2 inhibits the release of Smac from the mitochondria into the cytosol⁵⁰. We have demonstrated here that caspase-3 activity was required for complete caspase-8 processing following Fas engagement. This result suggests that before Smac release into the cytosol, which is inhibited by Bcl-2, caspase-3 is associated to XIAP and cannot remove its prodomain or trigger the complete cleavage of caspase-8. Interestingly, in Jurkat cytosolic extracts, caspase-8 activation induced by addition of cytochrome c was completely abrogated when caspase-3 was depleted⁵¹. This observation corroborates our results obtained in intact Jurkat cells and confirms the requirement for caspase-3 activity in caspase-8 activation.

The results presented here are consistent with a model in which critical components of Fas signaling are pre-assembled in the plasma membrane, notably in the lipid-rich compartment, as summarized in Figure 7. Upon Fas cross-linking, the association of FADD, caspase-8, and caspase-3 in the DISC increase and lead to caspase-3 processing into its 20 and 12 kDa subunits. The partially processed caspase-3 is sequestered by XIAP until released by mitochondrial proteins such as Smac/DIABLO. Caspase-3 then removes its prodomain and its activity results in the complete cleavage of caspase-8 and amplification of Smac and cytochrome c release into the cytosol. This model suggests that caspase-3 is not only an effector caspase but is also a central molecule in the amplification of Fas signaling in T lymphocytes.

Acknowledgements

We wish to thank Dr S. F. Dowdy (Howard Hugues Medical Institute, CA, USA), Dr D. Lynch (Immunex Corporation, CA, USA), Dr G. C. Shore (McGill University, Montreal, Canada), Dr J. M. Adams (Walter and Elisa Institute, Melbourne, Australia), Dr S. Roy (Merck-Frosst, Kirkland, Quebec, Canada) and Dr J. Hiscott (Lady Davis Institute, Montreal, Canada) for providing valuable reagents and useful comments.

Reference list

1. Lenardo, M., K.M.Chan, F.Hornung, H.McFarland, R.Siegel, J.Wang, and L.Zheng. 1999. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu.Rev.Immunol.* 17:221-253.
2. Ashkenazi, A. and V.M.Dixit. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308.
3. Ashkenazi, A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat.Rev.Cancer* 2:420-430.
4. Wallach, D., E.E.Varfolomeev, N.L.Malinin, Y.V.Goltsev, A.V.Kovalenko, and M.P.Boldin. 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu.Rev.Immunol.* 17:331-367.
5. Strasser, A., L.O'Connor, and V.M.Dixit. 2000. Apoptosis signaling. *Annu.Rev.Biochem.* 69:217-245.
6. Kumar, S. 1999. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death.Differ.* 6:1060-1066.
7. Rathmell, J.C. and C.B.Thompson. 1999. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu.Rev.Immunol.* 17:781-828.
8. Shi, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol.Cell* 9:459-470.
9. Woo, M., R.Hakem, M.S.Soengas, G.S.Duncan, A.Shahinian, D.Kagi, A.Hakem, M.McCurrach, W.Khoo, S.A.Kaufman, G.Senaldi, T.Howard, S.W.Lowe, and T.W.Mak. 1998. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* 12:806-819.
10. Enari, M., H.Hug, and S.Nagata. 1995. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 375:78-81.

11. Tewari, M., L.T. Quan, K.O'Rourke, S.Desnoyers, Z.Zeng, D.R.Beidler, G.G.Poirier, G.S.Salvesen, and V.M.Dixit. 1995. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81:801-809.
12. Varfolomeev, E.E., M.Schuchmann, V.Luria, N.Chiannikulchai, J.S.Beckmann, I.L.Mett, D.Rebrikov, V.M.Brodianski, O.C.Kemper, O.Kollet, T.Lapidot, D.Soffer, T.Sobe, K.B.Avraham, T.Goncharov, H.Holtmann, P.Lonai, and D.Wallach. 1998. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*. 9:267-276.
13. Hisahara, S., T.Araki, F.Sugiyama, K.Yagami, M.Suzuki, K.Abe, K.Yamamura, J.Miyazaki, T.Momoi, T.Saruta, C.C.Bernard, H.Okano, and M.Miura. 2000. Targeted expression of baculovirus p35 caspase inhibitor in oligodendrocytes protects mice against autoimmune-mediated demyelination. *EMBO J.* 19:341-348.
14. Boldin, M.P., T.M.Goncharov, Y.V.Goltsev, and D.Wallach. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85:803-815.
15. Fernandes-Alnemri, T., R.C.Armstrong, J.Krebs, S.M.Srinivasula, L.Wang, F.Bullrich, L.C.Fritz, J.A.Trapani, K.J.Tomaselli, G.Litwack, and E.S.Alnemri. 1996. 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* 93:7464-7469.
16. Muzio, M., A.M.Chinnaiyan, F.C.Kischkel, K.O'Rourke, A.Shevchenko, J.Ni, C.Scaffidi, J.D.Bretz, M.Zhang, R.Gentz, M.Mann, P.H.Krammer, M.E.Peter, and V.M.Dixit. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85:817-827.
17. Kischkel, F.C., S.Hellbardt, I.Behrmann, M.Germer, M.Pawlita, P.H.Krammer, and M.E.Peter. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated

proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14:5579-5588.

18. Hueber, A.O., A.M. Bernard, Z. Herincs, A. Couzinet, and H.T. He. 2002. An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep.* 3:190-196.
19. Brown, D.A. and E. London. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:111-136.
20. Janes, P.W., S.C. Ley, and A.I. Magee. 1999. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* 147:447-461.
21. Drevot, P., C. Langlet, X.J. Guo, A.M. Bernard, O. Colard, J.P. Chauvin, R. Lasserre, and H.T. He. 2002. TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J.* 21:1899-1908.
22. Guo, B., R.M. Kato, M. Garcia-Lloret, M.I. Wahl, and D.J. Rawlings. 2000. Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex. *Immunity.* 13:243-253.
23. Stauffer, T.P. and T. Meyer. 1997. Compartmentalized IgE receptor-mediated signal transduction in living cells. *J. Cell Biol.* 139:1447-1454.
24. Legler, D.F., O. Micheau, M.A. Doucey, J. Tschopp, and C. Bron. 2003. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF α -mediated NF- κ B activation. *Immunity.* 18:655-664.
25. Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J. Tomaselli, K.M. Debatin, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17:1675-1687.
26. Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J. Tomaselli, K.M. Debatin, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17:1675-1687.

27. Li,H., H.Zhu, C.J.Xu, and J.Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
28. Scaffidi,C., S.Fulda, A.Srinivasan, C.Friesen, F.Li, K.J.Tomaselli, K.M.Debatin, P.H.Krammer, and M.E.Peter. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17:1675-1687.
29. Srinivasula,S.M., P.Datta, X.J.Fan, T.Fernandes-Alnemri, Z.Huang, and E.S.Alnemri. 2000. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J.Biol.Chem.* 275:36152-36157.
30. Brown,D.A. and E.London. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J.Biol.Chem.* 275:17221-17224.
31. Dietrich,C., L.A.Bagatolli, Z.N.Volovyk, N.L.Thompson, M.Levi, K.Jacobson, and E.Gratton. 2001. Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys.J.* 80:1417-1428.
32. Nagahara,H., A.M.Vocero-Akbani, E.L.Snyder, A.Ho, D.G.Latham, N.A.Lissy, M.Becker-Hapak, S.A.Ezhevsky, and S.F.Dowdy. 1998. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat.Med.* 4:1449-1452.
33. Bilderback,T.R., R.J.Grigsby, and R.T.Dobrowsky. 1997. Association of p75(NTR) with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae. *J.Biol.Chem.* 272:10922-10927.
34. Hostager,B.S., I.M.Catlett, and G.A.Bishop. 2000. Recruitment of CD40 and tumor necrosis factor receptor-associated factors 2 and 3 to membrane microdomains during CD40 signaling. *J.Biol.Chem.* 275:15392-15398.
35. Cottin,V., J.E.Doan, and D.W.Riches. 2002. Restricted localization of the TNF receptor CD120a to lipid rafts: a novel role for the death domain. *J.Immunol.* 168:4095-4102.

36. Hueber, A.O., A.M. Bernard, Z. Herincs, A. Couzinet, and H.T. He. 2002. An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep.* 3:190-196.
37. Jones, R.G., A.R. Elford, M.J. Parsons, L. Wu, C.M. Krawczyk, W.C. Yeh, R. Hakem, R. Rottapel, J.R. Woodgett, and P.S. Ohashi. 2002. CD28-dependent activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly. *J. Exp. Med.* 196:335-348.
38. Chan, F.K., H.J. Chun, L. Zheng, R.M. Siegel, K.L. Bui, and M.J. Lenardo. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288:2351-2354.
39. Siegel, R.M., J.K. Frederiksen, D.A. Zacharias, F.K. Chan, M. Johnson, D. Lynch, R.Y. Tsien, and M.J. Lenardo. 2000. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288:2354-2357.
40. Shu, H.B., D.R. Halpin, and D.V. Goeddel. 1997. Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity.* 6:751-763.
41. Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P.H. Krammer, and S. Kirchhoff. 2001. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* 276:20633-20640.
42. Scaffidi, C., I. Schmitz, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274:1541-1548.
43. Micheau, O., M. Thome, P. Schneider, N. Holler, J. Tschopp, D.W. Nicholson, C. Briand, and M.G. Grutter. 2002. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* 277:45162-45171.
44. Chang, D.W., Z. Xing, Y. Pan, A. Algeciras-Schimmich, B.C. Barnhart, S. Yaish-Ohad, M.E. Peter, and X. Yang. 2002. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J.* 21:3704-3714.

45. Muzio, M., B.R. Stockwell, H.R. Stennicke, G.S. Salvesen, and V.M. Dixit. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 273:2926-2930.
46. Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J. Tomaselli, K.M. Debatin, P.H. Kramer, and M.E. Peter. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17:1675-1687.
47. Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.
48. Li, H., H. Zhu, C.J. Xu, and J. Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
49. Sun, X.M., S.B. Bratton, M. Butterworth, M. MacFarlane, and G.M. Cohen. 2002. Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *J. Biol. Chem.* 277:11345-11351.
50. Sun, X.M., S.B. Bratton, M. Butterworth, M. MacFarlane, and G.M. Cohen. 2002. Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *J. Biol. Chem.* 277:11345-11351.
51. Slee, E.A., M.T. Harte, R.M. Kluck, B.B. Wolf, C.A. Casiano, D.D. Newmeyer, H.G. Wang, J.C. Reed, D.W. Nicholson, E.S. Alnemri, D.R. Green, and S.J. Martin. 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.
52. Alam, A., M.Y. Braun, F. Hartgers, S. Lesage, L. Cohen, P. Hugo, F. Denis, and R.P. Sekaly. 1997. Specific activation of the cysteine protease CPP32 during the negative selection of T cells in the thymus. *J. Exp. Med.* 186:1503-1512.
53. Sharif-Askari, E., A. Alam, E. Rheaume, P.J. Beresford, C. Scotto, K. Sharma, D. Lee, W.E. DeWolf, M.E. Nuttall, J. Lieberman, and R.P. Sekaly. 2001. Direct cleavage of

the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *EMBO J.* 20:3101-3113.

Methods

Cells and reagents. The Jurkat cell line (clone E6-1) was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). The CH11 and M3 anti-Fas antibodies were obtained from Beckman-Coulter (CA, USA) and Immunex (CA, USA) respectively. Anti-FADD, anti-caspase-8 and anti-caspase-9 antibodies were obtained from BD-Transduction laboratories and Pharmingen (CA, USA). The anti-caspase-3⁵², anti-caspase-8, anti-LCK, anti-FLIP and anti-DFF⁵³ antibodies were generated in rabbits in our laboratory, using GST fusions with whole proteins. The anti-PARP antibody was purchased from BIOMOL (PA, USA) and the anti-Bcl-2 and anti-CD45 antibodies from Santa Cruz (CA, USA). The anti-Bap-31 antibody was a gift from Dr G.C. Shore (Department of Biochemistry, McGill University, Montreal, Canada). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG and goat anti-mouse IgG used in western blots were obtained from Jackson Immunolaboratories and N-octylglucoside from SIGMA.

Cell maintenance and transfections. Wild type and Bcl-2 expressing Jurkat T cells (JIB2) were maintained at 37°C and 5% CO₂ in RPMI-1640 (Gibco BRL, Burlington, Canada) supplemented with 10 % fetal calf serum. Bcl-2 inducible expression in Jurkat cells was obtained as follows. The Bcl-2-expressing system was produced by transferring an EcoR1/Bgl II fragment of the human Bcl-2 cDNA from the pIC-Bcl-2 plasmid, kindly provided by Dr J.M. Adams (The Walter and Eliza Hall Institute, Melbourne, Australia) and subcloned into the EcoR1 and BamH1 sites of the neo-CMVt vector, a kind gift from Dr J. Hiscott (Lady Davis Institute, Montreal, Canada). The CMVt-Bcl-2 construct was transfected by electroporation into a Jurkat clone carrying the CMVt-rtTA plasmid. The clones carrying both vectors were selected for puromycin and neomycin resistance and subcloned by limiting dilution. The JIB2 clone was selected for its low basal Bcl-2 expression, and high resistance to anti-Fas induced apoptosis following Bcl-2 expression in the presence of 1 µg/ml of the tetracycline analog, doxycyclin (SIGMA).

Fusion protein construction, production and purification. Human caspase-3 cDNA cloned into *Bam* HI-*Eco* RI sites of the pBSK plasmid, has served as a template to introduce a point mutation into caspase-3 catalytic site QA(C163A)RG in order to generate an inactive dominant negative variant of caspase-3 (C3c/s). This was achieved by a two-rounds PCR using two sets of overlapping primers. PCR products were then digested using *Kpn* I and *Eco* RI restriction sites then inserted in frame 3' to the His₆ stretch/TAT linker of the pTAT vector, a generous gift from Dr Steven F. Dowdy (Howard Hugues medical institute at the Washington University in St Louis, USA). After verification of the nucleic acid sequences, TAT-C3c/s fusion protein

production was carried out in BL21 pLys S strain (Novagen, WI, USA). Highly expressing clones were selected and induced to produce fusion proteins using IPTG (1 mM). Protein was extracted from bacteria by sonication in a denaturing buffer composed of 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, and 8M urea (pH 8). Resulting extracts were cleared by centrifugation for 15 min at 6000 rpm. TAT-fusions were purified from cleared extracts by affinity chromatography using Nickel-NTA (Invitrogen, Canada) and eluted by imidazole (Sigma, USA). The protein was further subjected to gel filtration chromatography on Sephadex G-25, PD-10 columns (Pharmacia/Abbiotech, Canada) in order to remove urea and imidazole, then stored at 4°C until needed for functional assays.

Apoptosis assay. Apoptosis was induced with anti-Fas antibodies added for the indicated times. Cell aliquots (10^5 cells) from each condition were suspended and incubated for 10 min in binding buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, and 1.8 mM CaCl₂/pH 7.4) containing 1 µg/ml propidium iodide (Sigma Chemicals, Canada) and 1 µg/ml FITC-conjugated Annexin V (An V) (BioLynx, Canada). Apoptosis was monitored by FACS using the FL-1 and FL-2 detectors on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). Assessment of the mitochondrial transmembrane potential (MTP) was performed by incubation of cell suspensions for 30 min at 37°C in PBS containing 12 nM DiOC₆ (Molecular Probes Inc., OR, USA). The staining was monitored by FACS using the FL-1 detector following extensive washing in PBS buffer. At least 10^4 cells were acquired for each sample.

Western blotting. Cell lysates (20-50 µg protein per lane), immune complexes (for experiments on DISC collection) or lipid raft fractions were resolved by SDS-PAGE on 12-14% gels and transferred to nitrocellulose HyBond-C membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Canada). Membranes were blocked with 5% skimmed milk in PBS 0.05% Tween 20 (PBST) for 2 hours at room temperature then incubated with the appropriate antibody in the same solution overnight at 4°C. After three washes in PBST, blots were incubated for one hour at room temperature with horseradish peroxidase HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG. Blots were then washed three times with PBST and revealed by incubation with ECL-Plus western blotting detection kit (Amersham Pharmacia Biotech, Canada) and then developed on Kodak films.

Lipid raft extraction. Lipid rafts were prepared by sucrose gradient ultracentrifugation of cell lysates. Resting Jurkat cells (10^8 cells) or cells stimulated with 1 µg/ml anti-Fas antibody (CH11) for 7 min were washed in ice-cold PBS and lysed in 0.5 ml cold buffer (1% Triton X 100, 20 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6.5 containing protease inhibitors (Roche). The same procedure was used with 3×10^8

untreated or anti-CD3-stimulated PBMC. The lysates were cleared by centrifugation at 14000 rpm for 30 sec at 4°C and the supernatants subjected to sucrose gradient fractionation using ultracentrifugation (100000 x g, 4 °C, 17 hours). Eleven to 12 fractions of 1 ml were collected and N-octylglucoside (60 µg/ml) was added to dissolve lipids. 10 µl of each fraction were subjected to dot blot analysis using HRP-conjugated cholera toxin (Sigma, Canada) in order to detect GM1, a positive marker of rafts. 15-20 µl from each fraction are resolved by SDS-PAGE and subjected to western blot analysis for the screening of raft-associated proteins using the appropriate antibodies.

DISC immunoprecipitation. Jurkat cells (20×10^6) were left untreated or stimulated with 1 µg/ml anti-Fas antibody (CH-11) for the indicated time points. The stimulation was then stopped with ice-cold PBS and cells were lysed, on ice for 30 min, in PBS containing 0.1 % Nonidet P40 detergent and protease inhibitors. Lysates from untreated cells were incubated with 1 µg/ml of anti-Fas (CH11) on ice for 30 min. All the lysates were then centrifuged at 3500 rpm for 10 min at 4°C. The supernatants were incubated for 1 hour at 4°C with agarose beads coupled to goat anti-mouse IgM (Sigma, Canada) to immunoprecipitate CH-11 immune complexes. The beads were washed extensively with lysis buffer and subsequently recovered by centrifugation, resuspended in non-reducing 2X loading buffer, and boiled for 10 min. The composition of Fas complexes in different DISC elements was then analyzed by western blot using the appropriate antibodies.

Legends

Figure 1. Fas-induced processing of caspase-3 into p20 cleavage product occurs despite blockade of mitochondrial events. (A) Bcl-2 transfected cells were stimulated with 1 $\mu\text{g/ml}$ of Doxocyclin (DOX) for 36 h to stimulate Bcl-2 expression. Induced (+DOX) and non-induced cells (-DOX) were then subjected to anti-Fas treatment for 3 h with 250 ng/ml of CH-11 anti-Fas antibody. Apoptosis in each condition was monitored by FACs analysis after AnV staining. **(B)** Cells from the same experiment also served to monitor Fas-mediated mitochondrial depolarization by FACS analysis using the mitochondrial dye DiOC6. **(C)** Protein extracts from each time point in the same experiment were immunoblotted to monitor Bcl-2 expression and the cleavage status of caspase-3, caspase-8, caspase-9 and PARP. Results shown are representative of three independent experiments.

Figure 2. Caspase-3 and other apoptotic molecules are associated with lipid rafts in resting Jurkat cells and peripheral blood T lymphocytes. (A) Untreated Jurkat cells were lysed in 1% Triton X-100 buffer and subjected to lipid raft isolation by sucrose density gradient ultracentrifugation as described in Materials and Methods. The distribution of the lipid raft marker, the ganglioside GM-1 in different sucrose gradient fractions was controlled by slot blot analysis using an HRP-conjugated cholera toxin. **(B)** The same sucrose fractions analyzed in panel (A) were subjected to western blot analysis in order to verify the distribution of caspase-3, caspase-7, caspase-8, FLIP_L, caspase-9, FADD, and Lamin B between raft and non-raft plasma membrane compartments. Results are representative of three independent experiments. **(C)** Human PBMC were left untreated or stimulated with 1 $\mu\text{g/ml}$ of OKT3 for 8 h or 16 h. Apoptosis levels (percentage of Annexin positive cells) and expression of CD69 and Fas were assessed by flow cytometry. **(D)** Lipid rafts proteins (fractions 4 to 6) from resting or activated lymphocytes were extracted and subjected to western blot analysis for the presence of caspase-3 and p56^{Lck}. Results are from one representative experiment among two.

Figure 3. Fas ligation induces an increase in caspase-3 levels in lipid rafts. (A) Lipid raft were extracted from Jurkat cells that were left untreated (-) or stimulated with anti-Fas antibody (+) and raft fraction were analyzed by western blot for the presence of a raft marker, p56^{Lck} and the absence of a receptor excluded from rafts, the CD45. **(B)** In order to analyze the effect of Fas ligation on redistribution of death signaling molecules, fractions from the same experiment were analyzed for the presence of FADD, caspase-8 and caspase-3 by western blotting.

Figure 4. Analysis of the Fas-signaling complex (DISC) in the Jurkat cell line. Untreated cells (time 0) were first lysed and then incubated with anti-Fas antibody

before Fas immunoprecipitation as described in the Materials and Methods section. Stimulated cells were incubated with CH11 for the indicated time points at 37°C before cell lysis and cell surface Fas was immunoprecipitated using anti-mouse IgG-coupled agarose beads. Immune complexes were resolved by SDS-PAGE and subjected to western blot analysis for the presence of FADD, caspase-8, caspase-3 and NF- κ B (p65) using respective antibodies. An aliquot of the total lysate (TL) was loaded as a positive control. These data are from one out of two independent experiment giving the same results.

Figure 5. Caspase-3 cleavage producing the p20 species occurs early during Fas-induced apoptosis. **(A)** Cells were treated with 250 ng/ml of CH11 for indicated times and apoptosis was monitored by FACS analysis using AnV/PI double staining. AnV⁻ cells were counted as viable whereas AnV⁺ positive cells were counted as apoptotic. **(B)** Cell extracts from each time point in the same experiment were subjected to western blot analysis using anti-caspase-3, caspase-8, PARP, and DFF antibodies (Non specific bands recognized by the anti-caspase-8 antiserum are indicated by an asterisk). **(C)** Two hours following anti-Fas treatment, Jurkat cells were stained with AnV and positive and negative cells were purified using a cell sorter. Protein extracts from each population were analyzed by western blot using anti-caspase-3 or caspase-8 antibodies.

Figure 6. Caspase-8 processing in response to Fas-induced apoptosis is inhibited by a dominant-negative form of caspase-3. **(A)** TAT-C3c/s fusion protein was labeled with FITC and incubated with Jurkat cells at a concentration of 0.7 μ M for 1 hour. The transduction capacity of FITC-conjugated TAT-C3c/s was monitored by FACS analysis. **(B)** Jurkat cells treated or not with 0.7 μ M of TAT-C3c/s fusion protein were either cultured alone or stimulated for the indicated times with anti-Fas antibody. Apoptosis in each condition was monitored by flow cytometry using AnV staining. **(C)** Protein extracts from the same experiment described in panel (A) were immunoblotted with an anti-caspase-8 antibody.

Figure 7. The pre-assembly model. In contrast to the type-I/type-II models, the pre-assembly model proposes the pre-association of caspase-3, caspase-8 and other signaling molecules with the plasma membrane. Upon Fas ligation higher levels of these molecules are recruited and stabilized in lipid-rich compartments leading to the formation of a signaling core, the DISC, already containing effector caspases. However, caspase-3 auto-processing is inhibited by XIAP and the release of Smac from the mitochondria allows caspase-3 to dissociate from XIAP, remove its own prodomain and trigger caspase-8 processing. This results in the execution of apoptosis through

the cleavage of caspase substrates. Therefore, caspase-3 contributes to the amplification of caspase-8 activation.

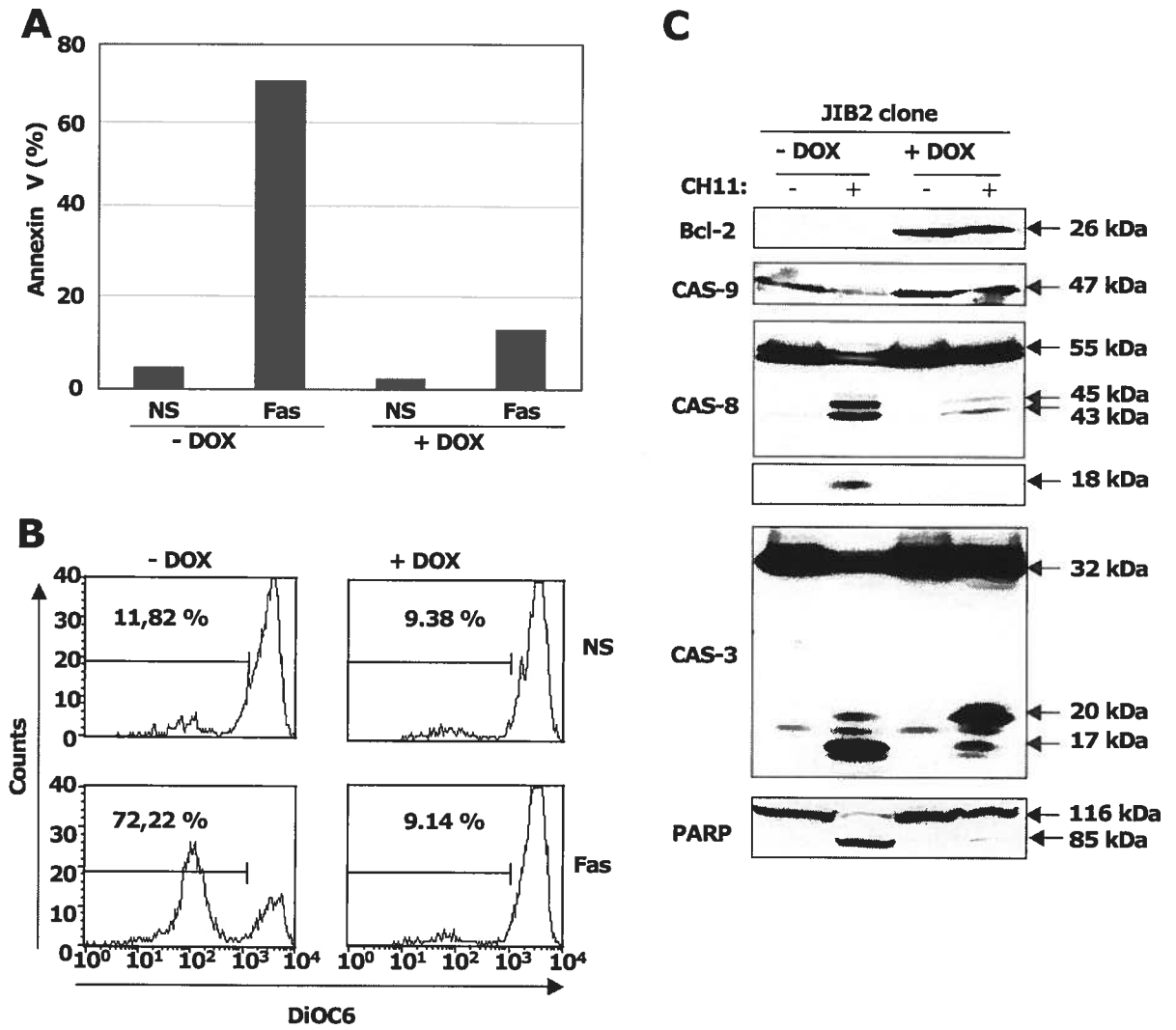


Figure 1

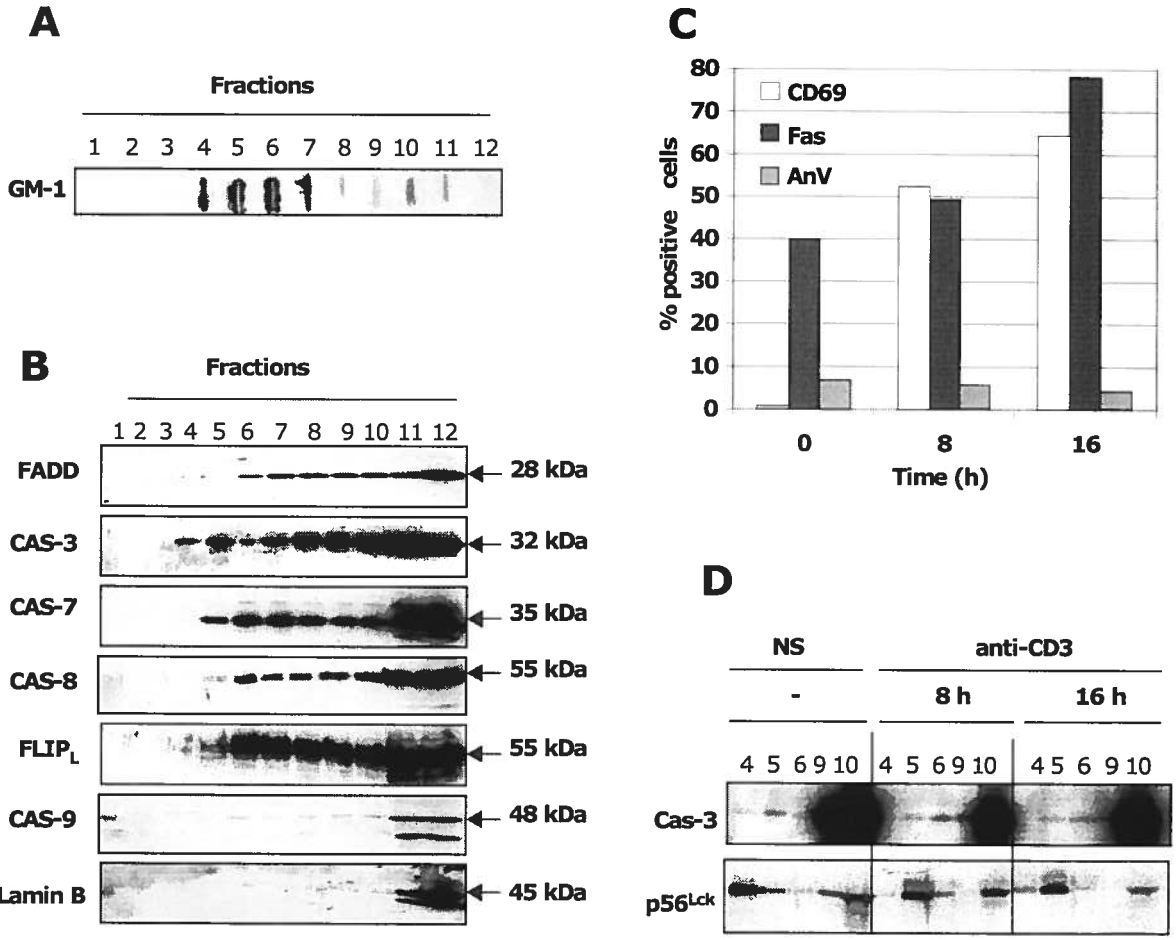


Figure 2

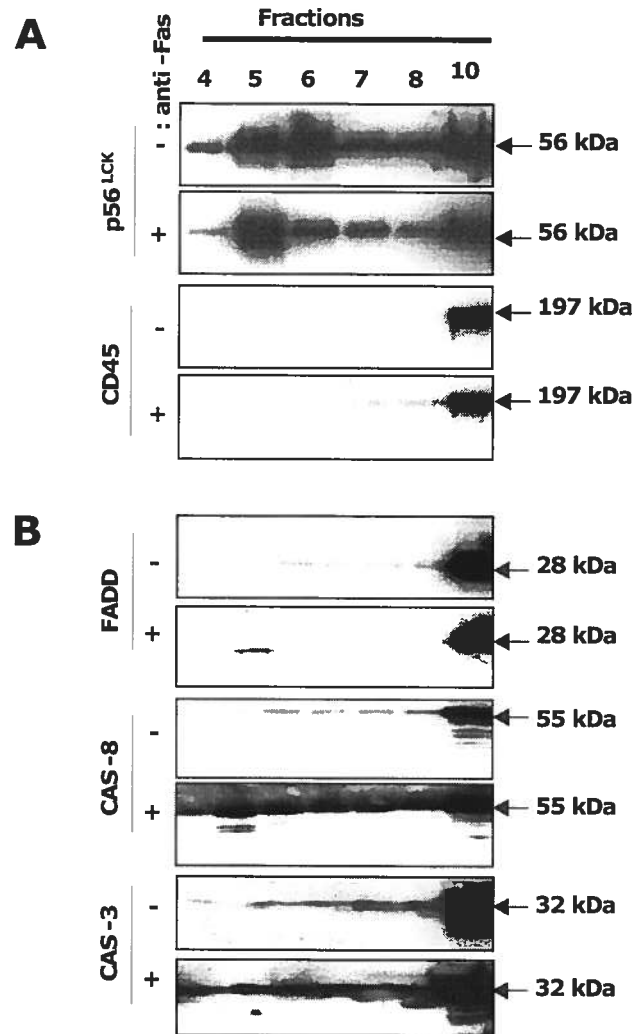
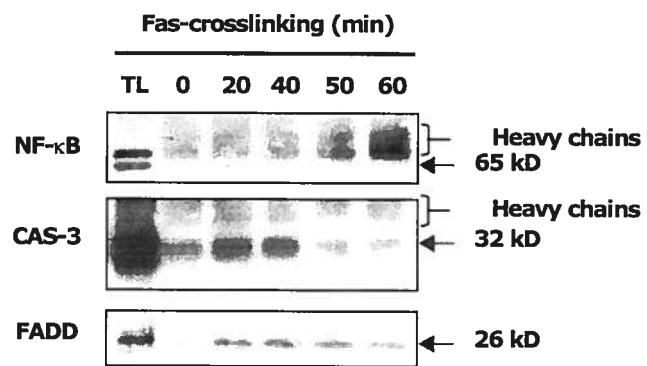
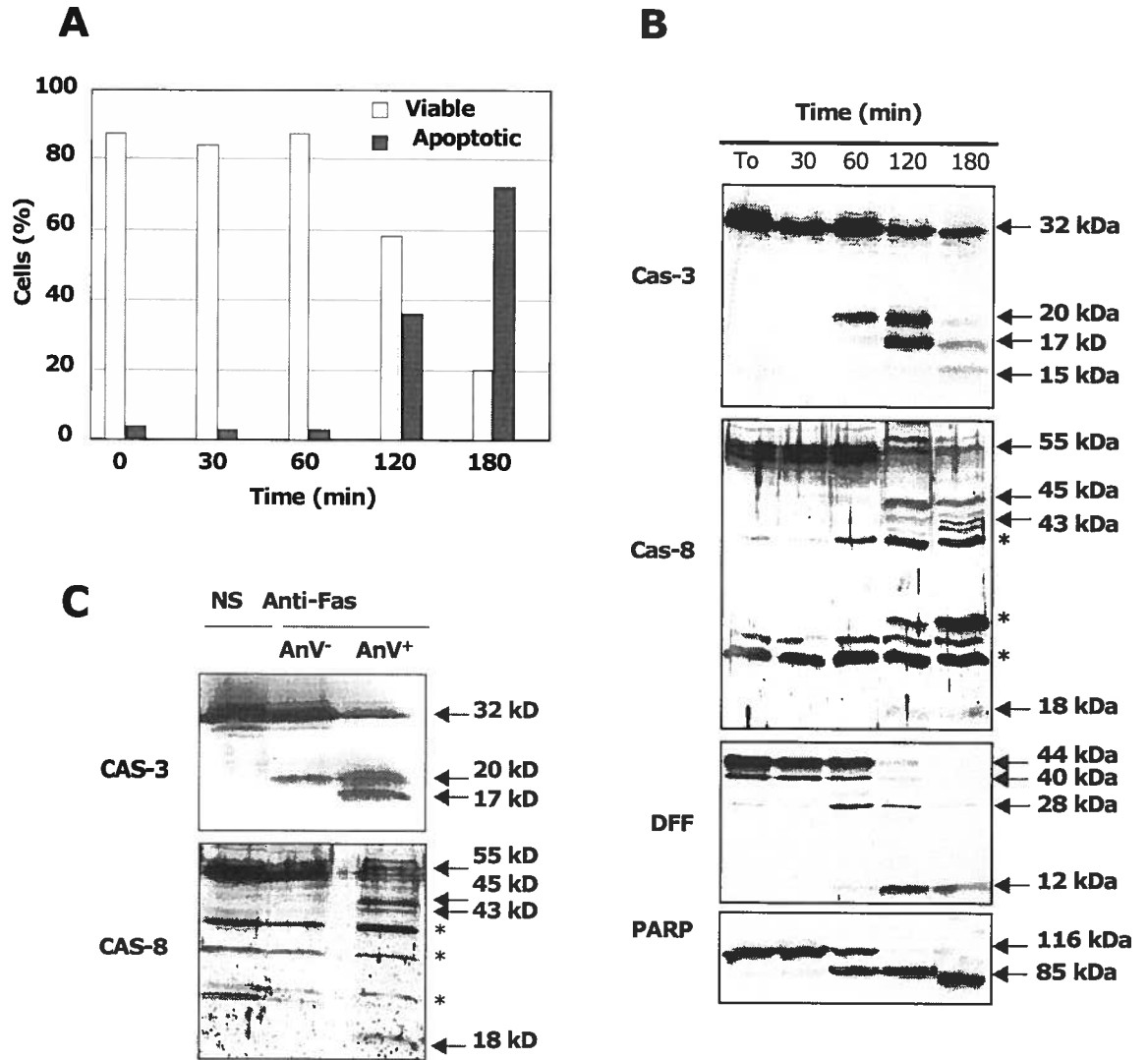


Figure 3

**Figure 4**



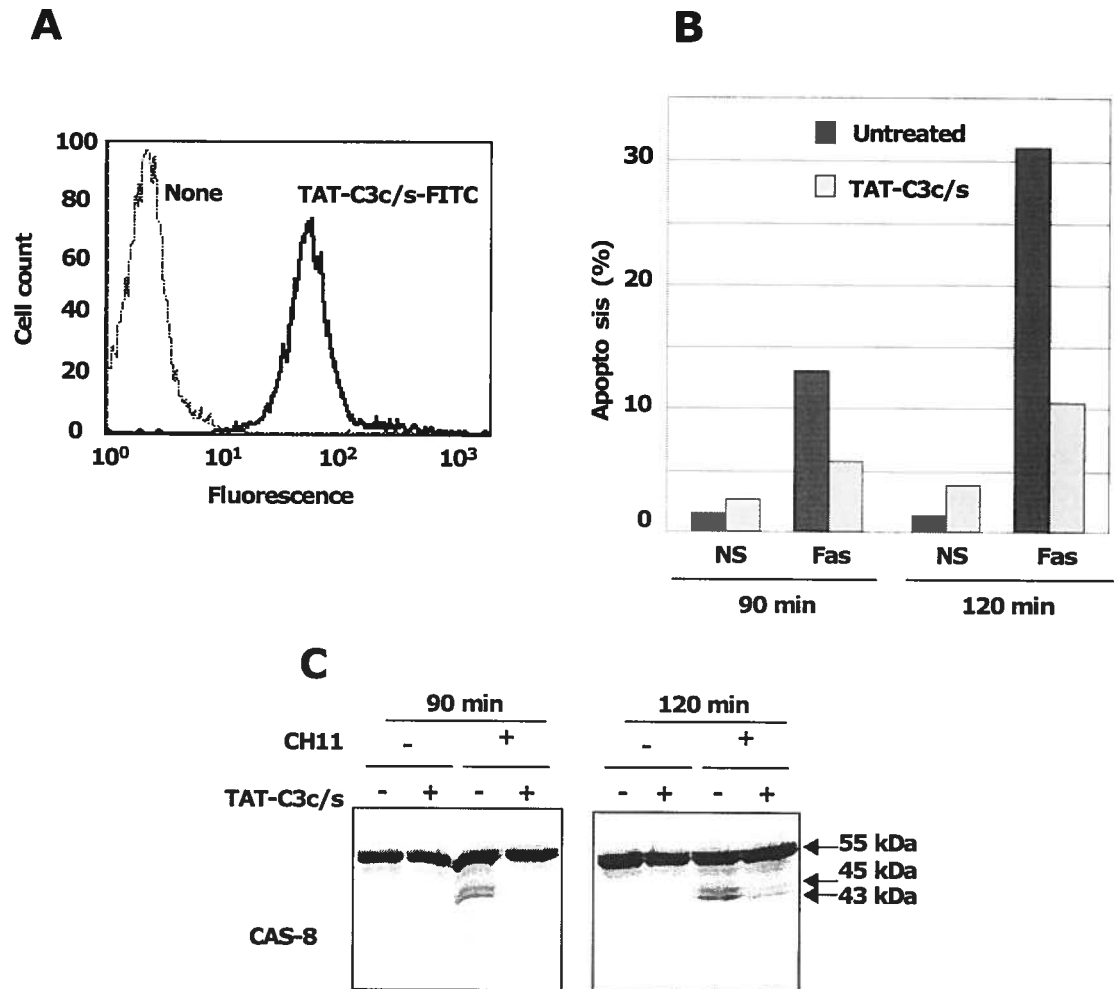


Figure 6

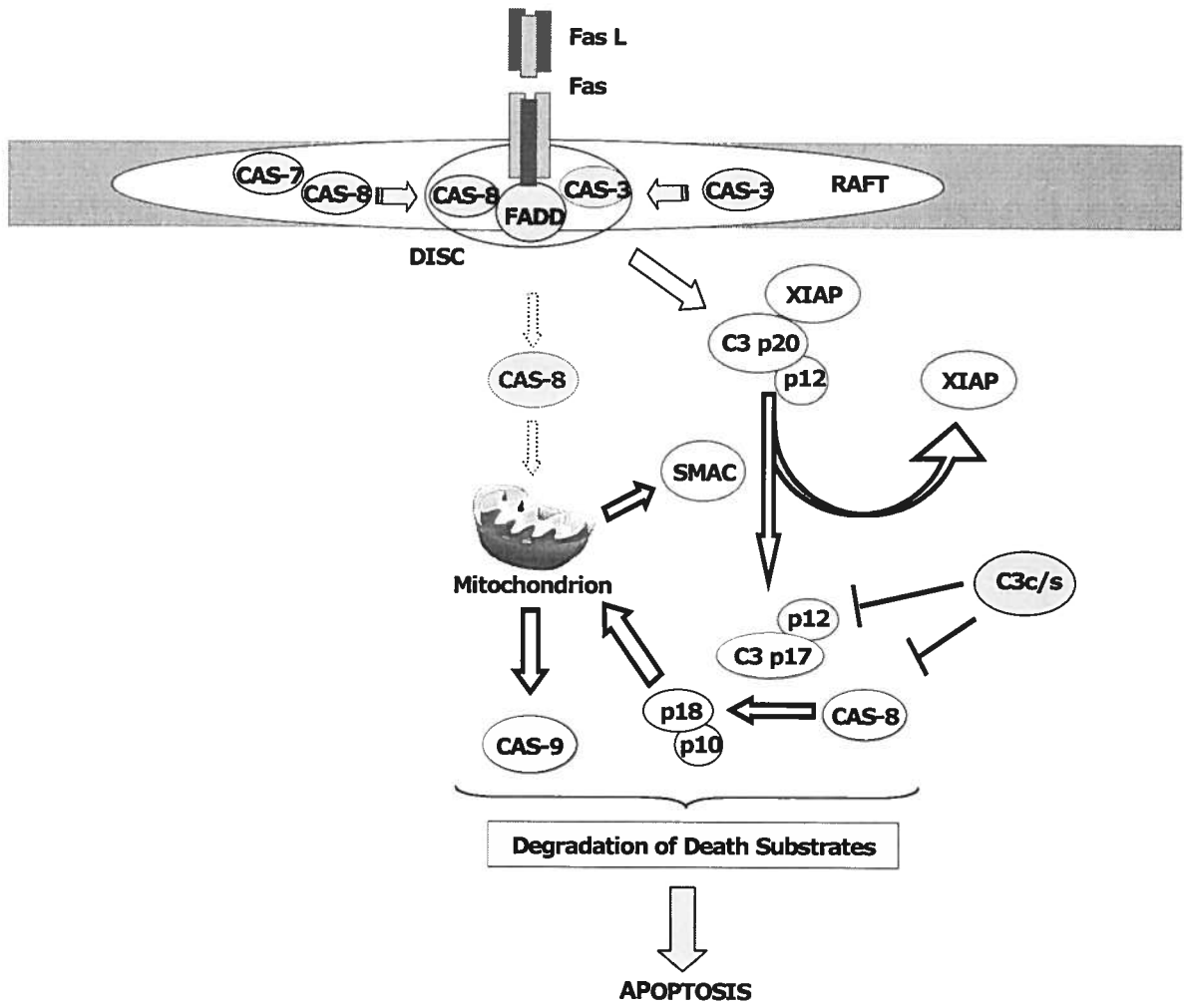


Figure 7

Troisième chapitre

Résumé

Granzyme B (GrB) est une sérine protéase dont l'activité protéolytique est cruciale à l'élimination des tumeurs et les infections virales par les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) et les natural killers (NK). Perforine (PFP) joue un rôle central parmi les molécules nécessaires à l'accès de cette protéase aux cellules cibles et leur cytolyse. De ce fait, la majorité des expériences qui reproduisent *in vitro* ce processus de cytotoxicité pour décortiquer son mécanisme utilisent GrB en combinaison avec PFP ou un vecteur moléculaire similaire. Or, l'utilisation de tels facteurs pourrait masquer la fonction spécifique de GrB et sa contribution individuelle au processus de cytotoxicité par les CTL. Ceci nous a mené à développer une chimère TAT-GrB issue de la fusion de GrB et le peptide TAT de VIH-1. Ayant la capacité de diffuser passivement à travers les membranes plasmiques (transduction), ce peptide devrait entraîner GrB à l'intérieur des cellules cibles évitant ainsi le recours aux vecteurs mentionnés ci-dessus. Les analyses biochimiques et fonctionnelles ont confirmé le succès de cette stratégie puisque la molécule d'intérêt est effectivement capable de s'accumuler passivement dans les cellules traitées. De même, TAT-GrB conserve l'activité protéolytique de GrB car elle catalyse des substrats fluorogéniques perméables ainsi que certaines molécules intracellulaires incluant caspase-3. Cette chimère est dotée d'une capacité cytolytique remarquable car elle induit l'apoptose dans une grande variété de lignées cellulaires incluant celles capables de déjouer la surveillance immunitaire. Par ailleurs, les données issues de l'utilisation de cette molécule sont en faveur du modèle qui exclu la nécessité des caspases à l'exécution de l'apoptose induite par les CTLs via GrB. L'ensemble de ces caractéristiques fait de cette molécule un outil moléculaire propice à l'exploration des mécanismes de la voie d'exocytose et au développement de stratégies thérapeutiques contre le cancer et les maladies infectieuses.

Mots clés: Apoptose/CTLs/Granzyme B/Caspases/Perforine/TAT

Rapport décrivant ma contribution personnelle à cet article

Après avoir maîtrisé la méthode de transduction des protéines basée sur le peptide hydrophobe de la protéine TAT du VIH-1, j'ai réussi à convaincre mon directeur de thèse d'exploiter cette technique pour adresser la question de l'accessibilité de GrB dans les cellules cibles.

Un collègue de laboratoire, Elias Haddad, étant en possession du gène (cDNA) de GrB, s'est proposé de cloner ce dernier ainsi que ses deux variantes mutées dans le vecteur pTAT offert par l'équipe de Stephan Dowdy. A la suite du clonage et la vérification de la séquence nucléotidique de ces molécules, j'ai entrepris leur production et leur purification. J'ai ensuite soumis ces protéines à une série de tests afin de confirmer leur identité et vérifier leur pureté. Après l'étape de purification, j'ai entamé l'analyse biochimique et fonctionnelle de la chimère en question afin d'adresser les points suivants:

- a)** Evaluer la capacité de transduction de la chimère dans les cellules traitées à l'aide de la microscopie confocale. Cet examen a été effectué par Elias Haddad qui maîtrise cette technique.
- b)** Déterminer si la molécule de fusion préserve l'activité enzymatique de GrB. J'ai évalué, à l'aide de cytométrie en flux, la capacité de la chimère à dégrader des substrats fluorogéniques perméables.
- c)** Déterminer si la molécule de fusion est capable d'induire l'apoptose dans les cellules traitées. J'ai évalué, à l'aide de cytométrie en flux, la capacité de la chimère à induire l'externalisation de la phosphatidylserine (PS) et la dégradation d'ADN.
- d)** Après avoir confirmé l'efficacité de la chimère à induire l'apoptose, il était question de vérifier si c'est l'activité serine protéase de GrB qui est responsable de cette apoptose. De ce fait, j'ai étudié l'effet de l'expression de PI9, un inhibiteur spécifique de GrB, sur l'activité cytolytique de la chimère. Ma collègue, Catherine Riou, s'est occupée de la purification des lymphocytes T primaires et l'analyse, par western blot, de leur teneur en PI9 et GrB.
- e)** Afin de déterminer la contribution des caspases à l'apoptose induite par la protéine de fusion, j'ai analysé l'état d'activation de certaines caspases et quelques-uns des substrats de mort à l'aide de western blot.
- f)** Dans le but de vérifier si l'apoptose induite par la chimère n'est pas limitée à la lignée Jurkat, mon directeur de thèse a suggéré d'étendre cette étude à d'autres lignées cellulaires. De ce fait j'ai évalué, avec l'aide de Catherine Riou, la capacité de la chimère à induire l'apoptose dans une douzaine de cellules cancéreuses d'origines tissulaires variées.

Generation of a novel fusion protein, TAT-granzyme B, with a dual capacity of transduction and apoptosis induction

Salah M. Aouad^{1,2}, Elias K. Haddad¹, Catherine Riou¹, and Rafick-Pierre Sékaly^{1,3}

Paper in preparation

¹Laboratoire d'immunologie, Département de Microbiologie et d'Immunologie, Université de Montréal, Montréal, H3C 3J7, Canada. ²Programme de biologie moléculaire, Université de Montréal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada. ³Department of Experimental Medicine, McGill University, Montréal, H3A 2B4, Canada.

Abstract

Granzyme B (GrB) is a potent serine protease present in cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and natural killer cells (NK) that serves in the elimination of cancerous and virally infected cells. Perforin (PFP), another molecule found in CTLs, is absolutely required for the entry of this lethal protease into target cells. Therefore, virtually all *in vitro* studies performed so far to explore this death pathway use GrB in combination with PFP or a similar molecular vehicle. However, this approach may mask the specific function of GrB and its exact contribution to CTL-assisted killing. In order to circumvent the requirement of PFP, we propose a strategy of passive diffusion of GrB by fusing the latter with the protein transduction domain of the HIV-1 TAT protein known to cross plasma membranes. Biochemical and functional analysis have confirmed the success of this strategy since the molecule of interest is able to enter treated cells autonomously. In addition, TAT-GrB conserves the proteolytic activity of GrB because it is able to process permeable fluorescent substrates as well as endogenous molecules including caspase-3. The fusion protein is also endowed with a remarkable cytolytic capacity since it induces apoptosis in a large variety of cell lines including those capable of immune evasion. Moreover, data generated with this chimera are in line with the model suggesting that caspases are dispensable for CTL-assisted killing via GrB. Taken together these features open the way to this molecular tool for the investigation of the exocytosis pathway as well as in clinical applications against cancer and infectious diseases.

Keywords: Apoptosis/CTLs/Granzyme B/Caspases/Perforin/TAT

Introduction

Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) are the primary effectors of cell-mediated immunity against intracellular bacterial and viral infections as well as invading tumors^{1;2}. CTLs or natural killers (NK cells) kill infected and malignant target cells by two different pathways: the TNF/TNFR pathway and the granule exocytosis pathway³. Engagement of TNF receptors by their physiological ligands induces the recruitment of specific Death Domain-containing proteins that form the death-inducing signaling complex (DISC)^{4;5}. This leads to the activation of caspase-8⁶, which initiates apoptosis of cells by activating downstream effector caspases. Apoptosis induced by the granule exocytosis pathway depends on the release of cytolytic molecules from CTL into target cells. These molecules including perforin and granzymes are pre-stored in intracellular granules inside CTL. Following recognition and interaction of CTL with its target cell, the granules migrate to the site of CTL/target contact and then release their lethal molecular arsenal including the pro-apoptotic serine proteases, granzymes^{7;8}.

The mechanism of entry of this enzyme to target cells depends on more than one molecule and remains under great debate. While some groups think that granzyme B (GrB) endocytosis occurs through the mannose-6-phosphate receptor, MPR expressed at the surface of target cells⁹ others state that this entry rather results from the interaction of this protease with some cofactors including the pore-forming protein perforin (PFP) and serglycin (SG)¹⁰. Furthermore, following endocytosis, GrB still needs to be released from the endoplasmic compartment to target cell cytosol, a step that is catalyzed by PFP^{11;12;13}.

GrB is the most potent and established among other granzymes found in cytotoxic granules¹⁴. Several studies including those performed on GrB^{-/-} mice have revealed that this enzyme plays a central role in the granule-mediated killing pathway¹⁵⁻¹⁷. The interest in GrB functions started when researchers discovered that it cleaves specific amino acid motifs after an aspartic acid residue in a manner similar to caspases and was thus believed to induce cell death only through activation of these cysteine proteases¹⁸⁻²⁰. It was later shown that GrB induces apoptosis independently of caspase activation as it can readily cleave some substrates such as DFF that leads to DNA degradation in the absence of caspase activity^{21;22}. The involvement of the mitochondrion in GrB-induced apoptosis is also under active investigation. It was proposed that GrB-induced apoptosis involves the mitochondrion through the cleavage of Bid²³. Recent works performed by Goping et al have suggested that mitochondrial events are required for the amplification of GrB death signal through the liberation of SMAC/DIABLO that neutralizes caspase-3 inhibition by XIAP²⁴. However, Bid^{-/-} and Bax/Bak^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) remain sensitive to GrB-induced

apoptosis despite the lack of cytochrome c release. Nevertheless, these cells still undergo mitochondrial depolarization making it hard to rule out the input of this organelle to GrB-mediated killing²⁵.

Most *in vitro* experiments performed so far to decipher the molecular mechanisms of CTL-assisted killing have used recombinant GrB in combination with purified PFP, streptolysin O (SLO) or adenoviral infection. These combinations may induce us to ascribe to GrB some catalytic functions that might actually result from a synergic effect of PFP and GrB. Therefore these approaches cannot inform us precisely about the individual contribution of GrB to the exocytosis pathway because they could mask the specific activity of this serine protease in this killing process. In addition, the variety of vehicles used complicates the interpretation and comparison of the data from different studies and may contribute to the controversy regarding the contribution of caspases to this killing pathway. This has prompted us to think of a molecular system capable of delivering GrB into the cytosol of desired cells without the need of PFP or any other molecular vehicle in order to assess the exact and individual contribution of this serine protease to the granule-mediated killing

Introduction of exogenous molecules, including foreign DNA and proteins, into cell lines and primary cells has always been difficult. Fortunately, certain proteins such as HIV-1 TAT protein, possesses a stretch of hydrophobic amino acids that is endowed with an inherent activity of diffusion across plasma membranes²⁶. This hydrophobic TAT peptide has been used extensively to introduce exogenous molecules with high transduction levels *in vitro* into cultured cells or *in vivo* in mice^{26;27}.

Here, we report the generation of a recombinant fusion molecule between TAT and the mature form of GrB, TAT-GrB, capable in the same time of diffusing into and killing treated cells. The physico-chemical and functional characterization of the chimera presented in this study depicts the success of this concept and could serve as a molecular basis for its utilization in the investigations of the immune response as well as a therapeutic tool against cancer or persistent viral infections.

Results

Generation and characterization of TAT-GrB fusion protein

Granzyme B is naturally expressed as an inactive zymogen that requires maturation through proteolytic processing to produce an active protease^{28;29} (Figure 1A). In order to short cut the need of this maturation step in the context of our chimera, we chose to fuse only the mature active form of this enzyme with the TAT transduction domain along with a His₆ stretch required for affinity purification purposes (Figure 1B).

The TAT fusion GrB and its two mutant variants TAT-GrB Δ 1 (ser/ala 203), and TAT-GrB Δ 2 (ser/ala 198 and 203) were subjected to SDS-PAGE followed by comassie blue staining and western blot analysis. Coomassie blue staining reveals that wild type and mutant TAT-GrB fusions migrate at the predicted size (34 kDa) whereas the p16 fusion, a cell cycle inhibitor that will serve as irrelevant control throughout this study, migrates at 20 kDa (Figure 2A). Western blot analysis shows that all the fusion proteins were detected with the anti-His tag antibody (Figure 2B) while only TAT-GrB fusions were detected by anti-GrB antibody confirming the identity of each one of the purified fusion proteins.

In order to assess the transduction capacity of the chimera, we monitored the entry of TAT-GrB into Hela cells using immunofluorescence followed by confocal microscopy. This analysis revealed that the chimera possesses high transduction efficiency since more than 90 % of treated cells stained positive for TAT-GrB in two separate experiments. Figure 2C shows a diffuse yellow to orange staining resulting from overlapping green fluorescence corresponding to TAT-GrB and red fluorescence corresponding to actin-associated phalloidin, which indicates the cytoplasmic distribution of the chimera. This figure also reveals foci of strong fluorescence resulting most likely from the association of our chimera with intracellular membranes of certain organelles. This is not surprising if we consider the hydrophobic nature of TAT peptide and its affinity with lipids, which allow it to associate with membranes. The chimera also presents a peri-nuclear localization indicative of an apoptotic phenotype as was stated by previous works¹³.

Subsequently, we tested whether the chimera conserves the GrB-proteolytic activity following its transduction into target cells. We performed an in-cell enzymatic assay using permeable fluorogenic substrates that have been recently used to measure CTL mediated apoptosis³⁰. Flow cytometry analysis shows that TAT-GrB induces a dose-dependent increase of fluorescence in Jurkat cells loaded with these substrates (Figure 2D). The simple mutant variant, TAT-GrB Δ 1, induced intermediate increase in fluorescence only at higher doses while TAT-GrB Δ 2 or the irrelevant protein

TAT-p16 had very weak or no effect, which means that they are enzymatically inactive.

These results demonstrate that the proposed chimera preserves its GrB proteolytic activity following its transduction and further confirms the success of TAT-GrB transduction into target cells since it has access to intracellular synthetic substrates.

TAT-GrB fusion protein induces target cell death by apoptosis

To assess the capacity of the fusion protein to induce apoptosis we first monitored phosphatidylserine (PS) externalization using Annexin V (AnV) staining. TAT-GrB treatment induced a dose dependent increase of AnV staining in Jurkat cells revealing the cytolytic activity of this chimera (Figure 3A). Killing was very efficient because, in contrast to anti-Fas treatment, TAT-GrB mediated PS exposure reached more than 95 % of treated cells as illustrated in FACS plots by the complete shift of cells to the AnV⁺ phenotype (Figure 3B). Similar to what was observed in the *in vivo* enzymatic assay (Figure 2), high doses of TAT-GrB Δ 1 mutant were also able to induce some AnV staining (Figure 3A). This is reminiscent of granzyme A inactive mutant that was reported to conserve its chromium release activity despite the blockade of DNA fragmentation³¹. The residual activity observed with TAT-GrB Δ 1 is most likely due to compensation by the serine residue at position 189 since TAT-GrB Δ 2, mutated in this residue, induces weaker AnV staining. As expected, TAT-p16 was unable to induce PS exposure in treated cells even at high doses. These data demonstrate that TAT-GrB chimera exhibits a strong apoptosis-inducing capacity that is inherent to the protease activity of granzyme B.

Since CTLs were reported to induce DNA fragmentation in target cells¹⁵, we wanted to determine whether TAT-GrB chimera is also capable of inducing this alteration. Tunnel assay performed on Jurkat cells shows that TAT-GrB was indeed able to induce DNA fragmentation to levels comparable to those observed in Fas-induced apoptosis (Figure 3C). Again, treatment with a high dose of TAT-GrB Δ 1 induced DNA fragmentation to a relatively similar extent to the one observed with PS externalization while treatment with TAT-p16 had no effect on DNA integrity.

These observations demonstrate that following its transduction into target cells, the fusion protein induces structural and molecular damages such as plasma membrane depolarization and DNA fragmentation two well-established hallmarks of cell death by apoptosis.

TAT-GrB induced apoptosis results from its serine protease activity

Experiments presented in figure 3 indicate that TAT-GrB induces apoptosis through the serine protease activity of GrB since mutagenesis of serine residues in the catalytic site affects significantly this killing. However, the remaining killing seen with TAT-GrB Δ 1 mutant has prompted us to use an additional approach to further examine the contribution of the serine protease activity of GrB to target cell apoptosis. To this, we studied the effect of a known serine protease inhibitor on the killing capacity of TAT-GrB. Protease inhibitor 9 (PI9) is one of the few described cellular serine protease inhibitors (serpin) known to specifically interfere with granzyme B and protect cells from its cytolytic activity^{32;33}. Thus, we compared the capacity of TAT-GrB to induce apoptosis in Jurkat cells versus a B cell line, Raji, known to express this serpin^{32;33}. Data presented in figure 4A shows that the fusion protein kills Jurkat cells efficiently confirming data from figure 3. However, the fusion protein was not as effective in killing Raji cells, particularly at lower and medium doses where levels of AnV staining do not exceed the background. This finding is indicative but not sufficient to conclude that our chimera uses the serine protease activity of GrB to induce killing since we cannot rule out the contribution of undetermined factors to the resistance observed in Raji cells.

Studies performed by Bird and colleagues have shown that activated human peripheral blood lymphocytes (PBLs) express high levels of PI9 mRNA³². Therefore we chose to take advantage of this naturally occurring inducible system to study the effect of activation of PBLs on their sensitivity to TAT-GrB induced apoptosis. Figure 4B shows that the fusion protein is able to induce apoptosis in resting PBL readily and in a dose dependent manner but was unable to kill CD3-activated PBLs. This acquired resistance is in line with the abovementioned high expression of PI9 in activated PBLs. In order to confirm the positive correlation between the resistance of activated PBLs and PI9 expression in these cells, we examined the levels of this serpin in resting versus activated PBLs. Western blot analysis (Figure 4C) shows that basal levels of PI9 are quite high in PBLs by comparison to Jurkat cells. Interestingly, these levels get increased and their electrophoretic mobility is altered. The additional species of PI9 observed in activated PBLs were already reported and were associated with resistance to GrB-induced apoptosis^{32;33}. According to these studies, the high molecular weight form consists of an SDS-stable complex between PI9 and GrB, while the lower molecular weight band results from residual GrB-mediated cleavage of PI9. To verify whether the additional PI9 species seen in activated cells result really from the interaction of *de novo* upregulated PI-9 with internal granzyme B, we monitored the levels of these two molecules along with their electrophoretic mobilities in resting and

CD3-activated CD8 T lymphocytes. Figure 4D shows that CD3 crosslinking on CD8 T lymphocytes induces the upregulation of PI9 expression and results in the same high molecular weight band observed in activated PBLs, confirming the physiological occurrence of this phenomenon. Ligation of CD3 results also in concomitant upregulation of GrB protein in these cells. Surprisingly, the upregulated GrB displayed a slow migrating species with exactly the same size of the high molecular weight PI9 form (Figure 4D) confirming the presence of GrB/PI9 SDS-stable complex.

These findings indicate that a GrB-specific inhibitor is able to interfere with TAT-GrB mediated apoptosis, which demonstrates that this chimera kills target cells through the serine-protease activity of GrB.

TAT-GrB fusion protein triggers the internal death machinery in target cells

GrB was shown to operate as a caspase preferentially cleaving after aspartic acid residues, which confers this enzyme the ability to process/activate caspases^{18;19}. To determine whether TAT-GrB is able to trigger such molecular events inside target cells, we investigated the processing status of caspases using western blot analysis. Figure 5A shows that TAT-GrB treatment of Jurkat cells induces the processing of caspase-3 into an unusual high molecular weight cleavage product (~29kDa). This cleavage form is not observed in anti-Fas treated cells and probably results from the removal of the N-terminal 3 kDa prodomain of caspase-3. The processing profile also displays an intense 20 kDa band and a very weak 17 kDa band. The processing of this caspase is specific because cells treated with TAT-GrB mutants or the irrelevant fusion protein TAT-p16 did not contain the p29 and p17 forms and very little or no p20 cleavage product. Figure 5A shows also that TAT-GrB is not able to process caspase-8 and caspase-9, which indicates that this fusion protein does not trigger initiators of the internal cell death program.

The unusual activation profile of caspases shown in figure 5A prompted us to compare the activation status of caspase-3 induced by TAT-GrB treatment with the one resulting from standard methods such as the combination of GrB and adenovirus (GrB/Adv). Figure 5B shows that Jurkat cells subjected to GrB/Adv treatment display a complete processing of caspase-3 consisting of a 19 and 17 kDa cleavage products resulting from total degradation of the p20. However, treatment of Jurkat cells or two additional cell lines, SKBR3 and MDAMB231, with TAT-GrB results in the generation of p29 and p20 forms but not the p17 cleavage product. This confirms data from figure 5A and emphasizes the generalized occurrence of this activation pattern in different cell types. Interestingly, treatment of Jurkat cells with Ad/GrB in the presence of the caspase-specific inhibitor, z-VAD, resulted in the same accumulation of the p20 form

seen in TAT-GrB treated cells. These data highlight the difference between TAT-GrB and Ad/GrB in their efficiencies to activate this caspase and suggest that GrB proteolytic activity might be altered in the context of this chimera. However, the capacity of TAT-GrB to degrade fluorescent substrates and induce two well-established features of apoptosis (Figures 2D, 3A and 4A) prompted us to examine whether this chimera is able to induce the degradation of well-established death substrates. Therefore, we examined the integrity of PARP, Lamin B and DFF-45 in TAT-GrB treated Jurkat cells using western blot analysis. Figure 5C shows that TAT-GrB treatment induces only a weak cleavage of PARP but it is able to degrade Lamin B as efficiently as Fas ligation. The chimera is also able to process DFF45/ICAD although this cleavage is different from the one generated by Fas crosslinking and results in a 28 kDa product (Figure 5C). This probably results from a combination of the altered caspase-3 activation in response to TAT-GrB and the relatively weak efficiency of granzyme B itself to cleave DFF as reported before by our laboratory²². Again, the processing of these substrates is specific to the granzyme B moiety of the chimera since it is not observed in Jurkat cells treated with TAT-GrB mutants or the irrelevant fusion protein.

Together these data show that despite its incapability to fully activate caspases the chimera is able to degrade some crucial death substrates, which suggests that TAT-GrB induces target cell cytolysis in a caspase-independent manner.

TAT-GrB induced cytolysis is a broad phenomenon that affects a wide range of tumor cell types

Most of the data presented so far were carried-out on Jurkat tumor cell line. This could imply that the killing efficiency of our chimera is a phenomenon limited to this tumor type because of a genetic aberration. Therefore, we decided to extend our study to other cell types by screening tumor cell lines originating from different tissues, for their sensitivity to TAT-GrB. Figure 6 shows that cell lines such as Lovo (colorectal adenocarcinomas), H4 (neuroglioma), and Hela (cervical adenocarcinomas) are all sensitive to TAT-GrB but not TAT-GrB Δ 2. Surprisingly, TAT-GrB was also able to kill specifically the caspase-3 deficient breast carcinoma cell line, MCF-7, confirming the fact that TAT-GrB induced cytolysis is caspase independent. Table 1 that summarizes all the cell lines used in this study shows also that other tumor lines from lymphoid origin such as Molt-3, L1210, Daudi and K562 are also sensitive to TAT-GrB fusion protein.

These results demonstrate that the cytolytic activity of this molecule is not restricted to Jurkat T cells.

TAT-GrB fusion protein kills some of tumor lines that are resistant to CTL mediated apoptosis

The mechanisms by which GrB enter target cells and have access to intracellular substrates are not fully understood. Recently, it was shown that GrB enters target cells by binding to mannose 6-phosphate receptor (MPR), a newly identified GrB receptor found on the surface of target cells. Tumor lines that are deficient in this receptor were shown to be resistant to CTL mediated apoptosis, or to recombinant GrB and perforin treatments⁹. If the concept of autonomous entry offered by the TAT transduction system is truly efficient, then TAT-GrB should induce apoptosis even in MPR-deficient cells. To this end, we investigated the capacity of TAT-GrB to induce apoptosis in two MPR-deficient tumor lines, SK-BR-3 and MDA-WT-231. Figure 7A shows that TAT-GrB, but not TAT-GrB Δ 2, is able to induce PS externalization in Jurkat as well as MDA-MB-231 cells. However the chimera was unable to induce such structural alteration in SK-BR-3 cells. Similarly, the chimera was able to induce DNA fragmentation only in Jurkat and MDA-MB-231 cells but not in SK-BR-3 cells (Figure 7B). The resistance of SK-BR-3 cells is most probably due to an inherent genetic defect since the MDA-MB-231 cell line lacking this same receptor is sensitive to the chimera. This is confirmed by data from figure 5B showing that TAT-GrB is able to process caspase-3 in SK-BR-3 cells demonstrating that the chimera accumulates in the cytosol of these cells because it has access to intracellular molecules.

These results demonstrate that TAT-GrB fusion protein is able to bypass the requirement of GrB receptor. This further confirms the efficiency of TAT-GrB transducing activity and supports its effective killing capacity over a wide range of tumor cells.

Discussion

Granzyme B mediated apoptosis is greatly dependent on perforin and the presence of MPR on target cell membranes⁹. Several groups have used purified perforin, bacterial Streptolysin O (SLO), or adenoviral vectors to introduce GrB into cells^{11-13;34}. Here, we report a system that allows the autonomous introduction of GrB into target cells using the well-established TAT-peptide transduction strategy²⁶.

The results presented in this paper demonstrate that the concept of passive diffusion at the origin of TAT-GrB generation is successful in many respects. In fact, data from confocal microscopy (Figure 2C) demonstrate clearly that TAT-GrB has an intracellular distribution. *In vivo* enzymatic assay and western blot analysis confirmed this localization since the chimera has access to intracellular molecules such as permeable fluorescent substrates and endogenous caspase-3 (Figures 2D and 5A). This is further proven by the capacity of the chimera to kill one of the MPR-deficient cell lines validating the success of its transduction (Figure 7A and B). Furthermore, results from the enzymatic assay combined with the capacity of the fusion protein to degrade caspase-3 and death substrates demonstrate that TAT-GrB retains its proteolytic activity following its transduction into target cells (Figures 5B). Our data show also that the chimera has a wide range killing capacity since only two lines (Raji and SK-BR-3) out of the twelve tumor lines tested in this study displayed significant resistance to the chimera, while the remaining cell lines showed low (Daudi and H4) or no resistance (Figure 6 and Table 1). Moreover, TAT-GrB kills treated cells by apoptosis since it induces PS exposure and DNA fragmentation (Figure 3A). This killing is specific to the GrB moiety of the fusion protein and does not result from nonspecific toxicity of this chimera since constitutive or inducible expression of the GrB-specific inhibitor, PI9, blocks this killing (Figure 4).

Several studies have reported the capacity of GrB to process/activate caspases^{19;35;36}. Our data show that TAT-GrB leads to an unexpected pattern of caspase activation since caspase-8 and caspase-9 are not activated while caspase-3 activation is limited to two major cleavage products, p29 and p20 (Figure 5A and B). This limited activation pattern could be due to the fact that TAT-GrB does not reach its optimal proteolytic activity either because of its incomplete refolding once inside target cells or because of the N-terminal position of the His-TAT linker that may mimic the inhibitory N-terminal pro-domain found in GrB zymogen²⁹. Alternatively, TAT-driven GrB delivery might result in a cytosolic distribution distinct from the one achieved by adenovirus or PFP. Nevertheless, figure 5C shows that TAT-GrB induces the processing of crucial death substrates such as Lamin B, PARP, and DFF-45 despite the limited activation of caspase-3 and the lack of caspase-8 and caspase-9 activation. These

findings combined with the ability of the chimera to degrade fluorescent substrates and induce apoptosis in treated cells, not only demonstrate that TAT-GrB is active but they also suggest that this molecule induces apoptosis independently of caspases. This was further confirmed in experiments where we showed the capacity of the fusion protein to induce apoptosis even in the caspase-3-deficient cell line, MCF-7 (Figure 6). Consistently, Jurkat cells expressing spi-2, a CrmA homologue, are also sensitive to TAT-GrB cytolysis corroborating the lack of caspase-8 activation in TAT-GrB treated cells (data not shown and Figure 5A). Caspase-9 is neither activated in TAT-GrB treated Jurkat cells (figure 5A), which is in line with the fact that overexpression of a caspase-9 dominant negative version does not confer resistance to GrB-induced apoptosis²⁴. These observations are reminiscent of CTL-induced cytolysis that still occurs in the presence of complete caspase blockade either by peptide inhibitors or the pan-caspase viral inhibitor, p35³⁷. Taken together, these data demonstrate that caspases might be dispensable for TAT-GrB induced killing and suggest that our chimera kill target cells most likely through direct degradation of death substrates that culminate in DNA fragmentation and PS exposure. In fact, studies performed in our laboratory as well as others have shown that GrB is able to degrade a panoply of death substrates, including DFF-45, and induce apoptosis independently of caspases^{21;22;38;39}.

The ability of some cells to escape CTL-mediated killing is now believed to contribute to the development of cancers and the spreading of metastases^{40;41}. Downregulation or complete loss of expression of diverse components of the death machinery such as death receptors, caspases or GrB receptor has been reported in a variety of malignancies^{9;41-43}. On the other hand, upregulation of cellular or viral inhibitors of caspase such as Bcl-2, FLIP and IAPs contribute to the same extent to the development of these malignancies⁴⁴⁻⁴⁷ and further dampen their response to chemotherapy and radiation^{48;49}. Therefore, if endowed with selectivity to certain tumors, TAT-GrB could be an attractive alternative to these conventional therapies because it is able to kill autonomously a variety of cell types in a caspase-independent manner. Likewise, this molecule should certainly help in the investigation of the contribution of GrB to different phases of the immune response such as the execution phase where CTL kill target cells or during the downregulation phase where CTLs are eliminated by AICD.

The data documented in this report describe the generation and the biochemical characterization of a novel recombinant molecule resulting from GrB and the protein transduction domain of the HIV-1 TAT protein known to cross plasma membranes. This characterization revealed that adenoviral or PFP-independent administration of GrB is able to induce cell death in a variety of cell types. Interestingly, this method of delivery

leads to degradation of some vital death substrates despite the altered activation pattern of caspases limited to incomplete processing of caspase-3. This is in line with previous works, including ours²², suggesting that GrB-induced apoptosis does not depend on caspases. Together these findings are consistent with the following model: During granule-mediated cytotoxicity, GrB enters target cells and triggers a first step of molecular and structural alterations. This step proceeds through direct degradation of a limited number of vital molecules and does not require caspases. However, these proteases should be required for the amplification of the GrB-initiating death signal.

Reference List

1. Barry, M. and R.C. Bleackley. 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat.Rev.Immunol.* 2:401-409.
2. Russell, J.H. and T.J. Ley. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu.Rev.Immunol.* 20:323-370.
3. Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1996. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu.Rev.Immunol.* 14:207-232.
4. Kischkel, F.C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14:5579-5588.
5. Chinnaiyan, A.M., C.G. Tepper, M.F. Seldin, K.O'Rourke, F.C. Kischkel, S. Hellbardt, P.H. Krammer, M.E. Peter, and V.M. Dixit. 1996. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* 271:4961-4965.
6. Muzio, M., A.M. Chinnaiyan, F.C. Kischkel, K.O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J.D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P.H. Krammer, M.E. Peter, and V.M. Dixit. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85:817-827.
7. Jenne, D.E. and J. Tschopp. 1988. Granzymes, a family of serine proteases released from granules of cytolytic T lymphocytes upon T cell receptor stimulation. *Immunol.Rev.* 103:53-71.
8. Bleackley, R.C., C.G. Lobe, B. Duggan, N. Ehrman, C. Fregeau, M. Meier, M. Letellier, C. Havele, J. Shaw, and V. Paetkau. 1988. The isolation and characterization of a family of serine protease genes expressed in activated cytotoxic T lymphocytes. *Immunol.Rev.* 103:5-19.
9. Motyka, B., G. Korbitt, M.J. Pinkoski, J.A. Heibin, A. Caputo, M. Hobman, M. Barry, I. Shostak, T. Sawchuk, C.F. Holmes, J. Gauldie, and R.C. Bleackley. 2000.

Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103:491-500.

10. Metkar,S.S., B.Wang, M.Aguilar-Santelises, S.M.Raja, L.Uhlin-Hansen, E.Podack, J.A.Trapani, and C.J.Froelich. 2002. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity*. 16:417-428.
11. Froelich,C.J., K.Orth, J.Turbov, P.Seth, R.Gottlieb, B.Babior, G.M.Shah, R.C.Bleackley, V.M.Dixit, and W.Hanna. 1996. New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J.Biol.Chem.* 271:29073-29079.
12. Browne,K.A., E.Blink, V.R.Sutton, C.J.Froelich, D.A.Jans, and J.A.Trapani. 1999. Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. *Mol.Cell Biol.* 19:8604-8615.
13. Shi,L., S.Mai, S.Israels, K.Browne, J.A.Trapani, and A.H.Greenberg. 1997. Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *J.Exp.Med.* 185:855-866.
14. Smyth,M.J. and J.A.Trapani. 1995. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol.Today* 16:202-206.
15. Heusel,J.W., R.L.Wesselschmidt, S.Shresta, J.H.Russell, and T.J.Ley. 1994. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76:977-987.
16. Ebnet,K., M.Hausmann, F.Lehmann-Grube, A.Mullbacher, M.Kopf, M.Lamers, and M.M.Simon. 1995. Granzyme A-deficient mice retain potent cell-mediated cytotoxicity. *EMBO J.* 14:4230-4239.
17. Trapani,J.A., K.A.Browne, M.J.Smyth, and D.A.Jans. 1996. Localization of granzyme B in the nucleus. A putative role in the mechanism of cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. *J.Biol.Chem.* 271:4127-4133.
18. Thornberry,N.A., T.A.Rano, E.P.Peterson, D.M.Rasper, T.Timkey, M.Garcia-Calvo, V.M.Houtzager, P.A.Nordstrom, S.Roy, J.P.Vaillancourt, K.T.Chapman,

- and D.W.Nicholson. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J.Biol.Chem.* 272:17907-17911.
19. Harvey,N.L., J.A.Trapani, T.Fernandes-Alnemri, G.Litwack, E.S.Alnemri, and S.Kumar. 1996. Processing of the Nedd2 precursor by ICE-like proteases and granzyme B. *Genes Cells* 1:673-685.
 20. Darmon,A.J., T.J.Ley, D.W.Nicholson, and R.C.Bleackley. 1996. Cleavage of CPP32 by granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. *J.Biol.Chem.* 271:21709-21712.
 21. Thomas,D.A., C.Du, M.Xu, X.Wang, and T.J.Ley. 2000. DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity.* 12:621-632.
 22. Sharif-Askari,E., A.Alam, E.Rheaume, P.J.Beresford, C.Scotto, K.Sharma, D.Lee, W.E.DeWolf, M.E.Nuttall, J.Lieberman, and R.P.Sekaly. 2001. Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *EMBO J.* 20:3101-3113.
 23. Barry,M., J.A.Heibein, M.J.Pinkoski, S.F.Lee, R.W.Moyer, D.R.Green, and R.C.Bleackley. 2000. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol.Cell Biol.* 20:3781-3794.
 24. Goping,I.S., M.Barry, P.Liston, T.Sawchuk, G.Constantinescu, K.M.Michalak, I.Shostak, D.L.Roberts, A.M.Hunter, R.Korneluk, and R.C.Bleackley. 2003. Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity.* 18:355-365.
 25. Thomas,D.A., L.Scorrano, G.V.Putcha, S.J.Korsmeyer, and T.J.Ley. 2001. Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:14985-14990.
 26. Nagahara,H., A.M.Vocero-Akbani, E.L.Snyder, A.Ho, D.G.Latham, N.A.Lissy, M.Becker-Hapak, S.A.Ezhevsky, and S.F.Dowdy. 1998. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat.Med.* 4:1449-1452.

27. Schwarze, S.R., A. Ho, A. Vocero-Akbani, and S.F. Dowdy. 1999. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285:1569-1572.
28. McGuire, M.J., P.E. Lipsky, and D.L. Thiele. 1993. Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I. *J. Biol. Chem.* 268:2458-2467.
29. Pham, C.T. and T.J. Ley. 1999. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96:8627-8632.
30. Liu, L., A. Chahroudi, G. Silvestri, M.E. Wernett, W.J. Kaiser, J.T. Safrit, A. Komoriya, J.D. Altman, B.Z. Packard, and M.B. Feinberg. 2002. Visualization and quantification of T cell-mediated cytotoxicity using cell-permeable fluorogenic caspase substrates. *Nat. Med.* 8:185-189.
31. Beresford, P.J., Z. Xia, A.H. Greenberg, and J. Lieberman. 1999. Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity.* 10:585-594.
32. Sun, J., C.H. Bird, V. Sutton, L. McDonald, P.B. Coughlin, T.A. De Jong, J.A. Trapani, and P.I. Bird. 1996. A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 271:27802-27809.
33. Bird, C.H., V.R. Sutton, J. Sun, C.E. Hirst, A. Novak, S. Kumar, J.A. Trapani, and P.I. Bird. 1998. Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Mol. Cell Biol.* 18:6387-6398.
34. Pinkoski, M.J., M. Hobman, J.A. Heibein, K. Tomaselli, F. Li, P. Seth, C.J. Froelich, and R.C. Bleackley. 1998. Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood* 92:1044-1054.
35. Darmon, A.J., D.W. Nicholson, and R.C. Bleackley. 1995. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377:446-448.

36. Fernandes-Alnemri,T., R.C.Armstrong, J.Krebs, S.M.Srinivasula, L.Wang, F.Bullrich, L.C.Fritz, J.A.Trapani, K.J.Tomaselli, G.Litwack, and E.S.Alnemri. 1996. 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* 93:7464-7469.
37. Sarin,A., M.S.Williams, M.A.Alexander-Miller, J.A.Berzofsky, C.M.Zacharchuk, and P.A.Henkart. 1997. Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases. *Immunity*. 6:209-215.
38. Andrade,F., S.Roy, D.Nicholson, N.Thornberry, A.Rosen, and L.Casciola-Rosen. 1998. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity*. 8:451-460.
39. Browne,K.A., R.W.Johnstone, D.A.Jans, and J.A.Trapani. 2000. Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. *J.Biol.Chem.* 275:39262-39266.
40. Hanahan,D. and R.A.Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
41. Wajant,H., K.Pfizenmaier, and P.Scheurich. 2002. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. *Apoptosis*. 7:449-459.
42. Kurokawa,H., K.Nishio, H.Fukumoto, A.Tomonari, T.Suzuki, and N.Saijo. 1999. Alteration of caspase-3 (CPP32/Yama/apopain) in wild-type MCF-7, breast cancer cells. *Oncol.Rep.* 6:33-37.
43. Fulda,S., M.U.Kufer, E.Meyer, F.van Valen, B.Dockhorn-Dworniczak, and K.M.Debatin. 2001. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 20:5865-5877.
44. Thomas,R.K., A.Kallenborn, C.Wickenhauser, J.L.Schultze, A.Draube, M.Vockerodt, D.Re, V.Diehl, and J.Wolf. 2002. Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Am.J.Pathol.* 160:1521-1528.
45. Reed,J.C. 1999. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J.Clin.Oncol.* 17:2941-2953.

46. Ambrosini,G., C.Adida, and D.C.Altieri. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat.Med.* 3:917-921.
47. Uren,A.G., L.Wong, M.Pakusch, K.J.Fowler, F.J.Burrows, D.L.Vaux, and K.H.Choo. 2000. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr.Biol.* 10:1319-1328.
48. Johnstone,R.W., A.A.Ruefli, and S.W.Lowe. 2002. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108:153-164.
49. Fisher,D.E. 1994. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 78:539-542.
50. Alam,A., M.Y.Braun, F.Hartgers, S.Lesage, L.Cohen, P.Hugo, F.Denis, and R.P.Sekaly. 1997. Specific activation of the cysteine protease CPP32 during the negative selection of T cells in the thymus. *J.Exp.Med.* 186:1503-1512.
51. Ezhevsky,S.A., H.Nagahara, A.M.Vocero-Akbani, D.R.Gius, M.C.Wei, and S.F.Dowdy. 1997. Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:10699-10704.

Methods

Cells and Materials. The following cell lines: Jurkat (clone E6.1), Molt-3, Daudi, K562, L1210, LoVo, H4, HeLa, and MCF-7 were purchased from ATCC (WA, USA). MDA-MB-231 and SK-BR-3 cell lines were nicely provided by Dr Chris R Bleackley. The mouse anti-Fas mAb CH11 clone was purchased from Beckman-Coulter (CA, USA). Anti-caspase-8 mAb was obtained from BD-Transduction laboratories and Pharmingen (CA, USA). Anti-caspase-3⁵⁰ and anti-DFF antibodies were generated in rabbits in our laboratory. Anti-PARP mAb was purchased from BIOMOL (PA, USA). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG and anti-mouse IgG, used for immunoblots, were obtained from Jackson Immunolaboratories (USA). Anti-His tag was purchased from Invitrogen (Canada). Anti-GrB was brought from Santa Cruz (CA, USA). TRIC-conjugated phalloidin, Alexa 488-coupled-anti mouse IgG mAb and the APO-BrDU TUNEL assay kit were obtained from Molecular Probes Inc. (OR, USA). CytoxiLux Kit was provided by OncoImmunit, Inc (MD, USA).

Cell maintenance. Human lymphoid cancerous cell lines (leukemias and lymphomas) such as Jurkat, Molt-3, Daudi and K562 as well as the murine leukemia, L1210, were all maintained in RPMI (Gibco BRL-Invitrogen, Canada) 1640 containing 10 % Fetal bovine serum. Human colorectal adenocarcinoma, LoVo cell line, was maintained in Ham's F12K medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, and 10 % fetal bovine serum. The brain neuroglioma, H4 cell line was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 4.5 g/L glucose and 10% fetal bovine serum. Human cervical adenocarcinoma, HeLa, and the mammary gland epithelial adenocarcinoma, MCF-7 cell lines were maintained in Minimum essential medium (Eagle) (MEM) containing 2 mM L-glutamine, Earle's BSS containing 1.5 g/L sodium bicarbonate, 0.1 mM non-essential amino acids, 1.0 mM sodium pyruvate and 10% fetal bovine serum. Human mammary gland epithelial adenocarcinoma, MDA-WT-231 and SK-BR-3 were maintained in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) supplemented with 2.2g/L sodium bicarbonate, 100 µg/ml potassium penicillin G, 100 µg/ml streptomycin sulfate, 1.2 mM glutamine spike and 10% dialyzed FBS. All cell lines were cultured in 5% CO₂ at 37°C.

Fusion protein construction, production and purification. DNA sequence corresponding to mature GrB was amplified by PCR from full-length granzyme B cDNA. PCR product was digested using *Kp*NI and *Eco* RI restriction enzymes and cloned in frame 3' to the His₆ stretch/TAT linker of the pTAT vector, a generous gift from Dr Steven F. Dowdy (Howard Hughes medical institute at the Washington University in St Louis, USA)⁵¹. Granzyme B mutants consisting of a simple Ser to Ala 203 (TAT-GrBΔ1) and a double mutant Ser/Ala 198 and 203 (TAT-GrBΔ2) were generated from pTAT-

GrB construct by two-rounds PCR using two sets of overlapping primers. PCR products were then cloned in the pTAT vector as described above. The p16-containing pTAT plasmid was a generous gift from Dr Steven F. Dowdy⁵¹. Following the verification of their nucleic acid sequence, all constructs were transformed in *E. coli*/BL21 pLys S strain (Novagen, WI, USA) for recombinant protein production. Highly expressing clones were selected and induced to produce fusion protein using IPTG (1 mM). Proteins were extracted from bacteria with harsh lysis and sonication in a denaturing buffer composed of 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, and 6M guanidin-HCl (pH 8). Resulting extracts were cleared by centrifugation (15 min at 6000 rpm). TAT-fusions were purified from cleared extracts by affinity chromatography using Nickel-NTA (Invitrogen, Canada) and eluted by imidazole (Sigma, USA) in urea-containing buffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, and 6M guanidin-HCl and 250 mM imidazole pH 8). The purified protein fraction was further subjected to gel filtration chromatography on Sephadex G-25, PD-10 columns (Pharmacia/Abbiotech, Canada) in order to remove urea and eluted in TED buffer (10 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 10% Glycerol pH7.5). The purified proteins were stored at 4°C until needed for functional assays.

Monitoring TAT fusion proteins transduction (confocal Microscopy). HeLa cells were grown on polylysine-coated glass cover slips (Baxter Diagnostics Inc. IL, USA) and treated with TAT-GrB fusion protein for 2 hours at 37°C. Cells were then washed with PBS and fixed at room temperature for 15 min with 4% Paraformaldehyde (PFA). Fixed cells were permeabilized for 10 min in 0.2% Triton X-100 in PBS, washed with PBS and blocked for one hour at room temperature in 3% BSA-containing PBS. After a brief wash cells were labeled with mouse anti-GrB mAb and TRITC-conjugated Phalloidin (red) for staining of cytoplasmic actin. Intracellular immune complexes of TAT-GrB and anti-GrB mAbs were further revealed by anti-mouse IgG coupled to Alexa 488 (green). After three final washes with PBS, slides containing labeled cells were prepared for microscopic visualization using a mounting medium from Molecular Probes Inc. (OR, USA). Slides were then analyzed with a confocal microscope (ZEISS Jena, Germany) and photographs from two independent experiments were taken with a CCD camera.

***In vivo* enzymatic assay.** We adapted a novel fluorogenic cytotoxicity assay conceived to measure apoptosis induced in target cells by CTLs³⁰. Briefly, Jurkat cells were left untreated or incubated with increasing micromolar concentration of the indicated fusion proteins for 2 hours. In the last 30 minutes of the treatment, cell aliquots ($1-2 \times 10^5$) from each condition were treated with the permeable fluorogenic caspase substrates. Stained cells were extensively washed in PBS to remove excess staining and suspended in the manufacturer's staining buffer. Emission of fluorescence,

indicative of substrate processing, was monitored by FACS (Becton-Dickinson) using the FL-1 filter.

Apoptosis induction and measurements. Cells were treated as suspensions in the case of Jurkat, Molt-3, K562, and L1210 cell lines whereas Daudi, LoVo, H4, HeLa, MCF-7, MDA-WT-231 and SK-BR-3, adherent cell line were first washed with PBS, trypsinized with 0.25% Trypsin solution and then treated. Cells suspended in the appropriate culture medium were left untreated (None/NT), treated with anti-Fas mAb (0.5-1 $\mu\text{g/ml}$) as a positive control for induction of apoptosis or with increasing amounts of TAT fusion proteins for two hours. GrB-induced target cell killing in the presence of Ad2 infection was carried out as described previously Pinkoski et al.³⁴ Briefly, Jurkat cells were pre-incubated with 1 μl of GrB (8.7 nM final concentration) in RPMI 1640 supplemented with 0.5% bovine serum albumin (BSA) for 1 h, followed by infection with type-2 Ad2 (10 plaque-forming units per cell) for an additional 4 h at 37°C. Cell aliquots (10^5 cells) from each sample were suspended and incubated for 10 min in AnV/PI binding buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, and 1.8 mM CaCl₂/pH 7.4) containing 1 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (Sigma Chemicals, Canada) and 1 $\mu\text{g/ml}$ FITC-conjugated Annexin V (BioLynx, Canada). AnV/PI double staining was monitored by FACS (Becton-Dickinson) using FL-1/FL-2 filters. For DNA fragmentation measurements Jurkat, MDA-WT-231 and SK-BR-3 cell lines were treated for 2 to 18 hrs with anti-Fas mAb (0.5-1 $\mu\text{g/ml}$) or with the indicated TAT-fusion protein (0.5 μM). DNA fragmentation was monitored by the TUNEL assay following the manufacturer instructions. Briefly, 2×10^6 cells were fixed in 1 % PFA for 15 min, washed with PBS and then incubated overnight in ice-cold 70% (V/V) Ethanol. Fixed cells were washed and DNA labeling was performed by incubation of cells for one hour at 37°C in a labeling buffer containing the deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme and the deoxythymidine analog (BrdUTP). Following extensive rinsing, DNA labeling was revealed using Alexa Fluor488-conjugated antiBrdU antibody. DNA fragmentation was monitored by FACS (Becton-Dickinson) using FL-1 filter.

Western blotting. Total proteins (20 μg) from cell lysates, were resolved by SDS-PAGE on 14% gels and transferred to nitrocellulose HyBond-C membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Canada). Membranes were blocked with 5% skimmed milk in PBS and 0.05% Tween 20 (PBST) for 2 hours at room temperature then incubated overnight at 4°C with the appropriate antibody in the same solution. After three washes in PBST, membranes were incubated for one hour at room temperature with horseradish peroxidase HRP conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG then washed three times with PBST. Blots were revealed by incubation, for 2 to 5 min, with

ECL-Plus western blotting detection solution (Amersham Pharmacia Biotech, Canada) and then developed on Kodak films.

Legends

Figure 1. Schematic representations of GrB primary structure and its cloning strategy in the pTAT vector.

(A) Primary structure of the human GrB zymogen and its mature active form resulting from the removal of its 20 amino acid N-terminal prodomain by dipeptidylpeptidase I (DPPI) mediated proteolysis. **(B)** Vector maps of mature wild type GrB, its mutant variants GrB Δ 1 and GrB Δ 2, and the irrelevant p16 gene. Each of these inserts was cloned in frame downstream of a His₆-TAT linker in the expression vector, pTAT.

Figure 2. Characterization of fusion proteins

(A) Fusion proteins produced as described in methods were separated on SDS gel and then identified by Coomassie blue staining (upper panel) and western blot analysis using anti-GrB and anti-His antibodies. **(B)** Hela cells were cultured on cover slips and treated with TAT-GrB fusion protein for 2 hours at 37°C and then washed extensively with PBS. Washed cells were fixed with 4% PFA and stained with mouse anti-GrB antibody and Phalloidin-TRITC (stain cytoplasmic actin) followed by anti-mouse-Alexa 488 (green). GrB is seen in green and phalloidin in red. **(D)** Jurkat cells were incubated with increasing doses of the indicated fusion proteins for 2 hours. Cells were loaded with permeable fluorescent substrates for the last 30 minutes of the treatment and washed. Emitted fluorescence was monitored by FACS analysis. This experiment was reproduced 3 times.

Figure 3. TAT-GrB fusion protein induces apoptosis in target cells.

(A) Jurkat cells were left untreated (NT), treated with anti-Fas mAb, clone CH-11 (Fas), as a positive control for apoptosis induction, or with different fusion proteins at the indicated concentrations for 2 hours. Cells were then washed and analyzed for annexin V and propidium iodide (An V/PI) double staining using FACS analysis. The Percentage of An V positive cells is presented as a histogram. This experiment was performed more than 3 times. **(B)** FACS plots comparing TAT-GrB killing capacity with that resulting from Fas ligation. **(C)** Jurkat cells were left untreated (NT), treated with anti-Fas mAb (Fas), or with the three indicated fusion proteins for 2 hours. Cells were then washed and analyzed for DNA degradation by the TUNEL assay using FACS analysis. Histogram represents the percentage of TUNEL positive cells in each treatment. This experiment was reproduced twice.

Figure 4. Cells expressing the serine protease inhibitor, PI9, are resistant to the cytotoxic activity of TAT-GrB.

(A) Jurkat or Raji cell lines were incubated with different amounts of TAT-GrB or TAT-GrB Δ 2 proteins for 2 hours. Cells were then washed and analyzed for An V/PI double staining using FACS analysis. The percentage of annexin V positive cells is presented as a histogram. This experiment was performed 3 times. **(B)** Peripheral blood lymphocytes (PBLs) from healthy donors were either left

untreated (resting) or activated with anti-CD3 antibody (OKT3, 1 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of recombinant IL-2 (100 units/ml) for 2 days. These cells were then subjected to 2 hours treatment with increasing amounts of TAT-GrB, washed and analyzed for An V/PI double staining using FACS analysis. Histograms represent the percentages of An V positive cells observed in each condition. **(C)** Total proteins resulting from the lysis of Jurkat cells, resting, and two days activated PBLs were resolved by SDS-PAGE then immunoblotted with a polyclonal antibody against PI9. **(D)** CD8⁺ T cells enriched from human PBLs were left unstimulated (NS) or activated as described in (B). Lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-PI9 antibody. Subsequently, the membrane that served for PI9 western blot was stripped and re-blotted anti-GrB antibody to monitor granzyme B levels in each condition. Experiments in (B), (C) and (D) were repeated twice.

Figure 5. TAT-GrB fusion protein is able to trigger target cells suicide program. Jurkat cells were treated for 2 hours with different amounts of the indicated fusion proteins and total proteins from respective cell lysates were separated by SDS-PAGE. **(A)** Resolved proteins were transferred to nitrocellulose membranes and blotted with antibodies against caspase-3, caspase-8, and caspase-9. **(B)** Jurkat cells were treated overnight with Ad/GrB (as indicated in methods) in the presence or absence of z-VAD (100 μM). In parallel Jurkat, SK-BR-3, and MDA-MB-231 cell lines were treated overnight with the indicated fusion proteins (0.6 μM) and total proteins from respective cell lysates were separated by SDS-PAGE. Resolved proteins were transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti caspase-3 antibody. **(C)** Lysates from the same condition in (A) were subjected to western blot analysis using antibodies that recognize death substrates such as DFF, PARP and Lamin B. The pattern of caspase activation and substrate degradation resulting from TAT-GrB treatment was repeated 3 times.

Figure 6. TAT-GrB fusion protein induces apoptosis in a wide variety of tumor cells. Tumor cells were left untreated or treated with TAT-GrB or TAT-GrB Δ 2 fusion proteins. Cells were then washed and apoptosis was monitored by An V/PI double staining using FACS analysis. The Percentage of An V positive cells is presented as a histogram. This experiment was repeated 3 times.

Table 1. Screening of additional tumor cell lines for their sensitivity to TAT-GrB mediated cytotoxicity. Tumor cells were subjected to the same treatment as in figure 5 and apoptosis was monitored by An V/PI double staining using FACS analysis. Data from cell lines described in figure 5 were included in this table.

Figure 7. TAT-GrB transducing activity is able to bypass the need for GrB receptor, MPR, for its entry to target cells. Jurkat cells and granzyme B receptor

deficient tumor lines, MDA-WT-231 and SK-BR-3, were incubated with either TAT-GrB or TAT-GrB Δ 2 for the indicated period of time. Cells were then harvested and apoptosis was monitored by An V/PI double staining and TUNEL assay using FACS analysis. Histograms represent the percentage of AnV positive and TUNEL positive cells resulting from each treatment. These experiments were repeated twice.

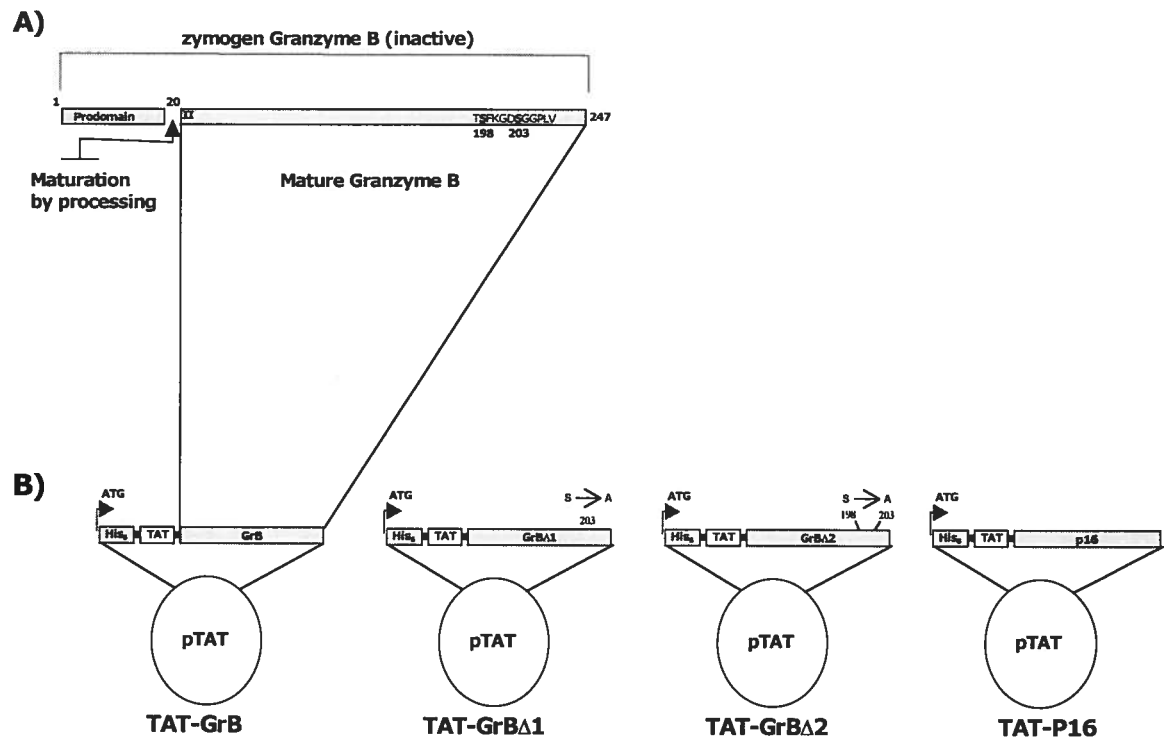


Figure 1

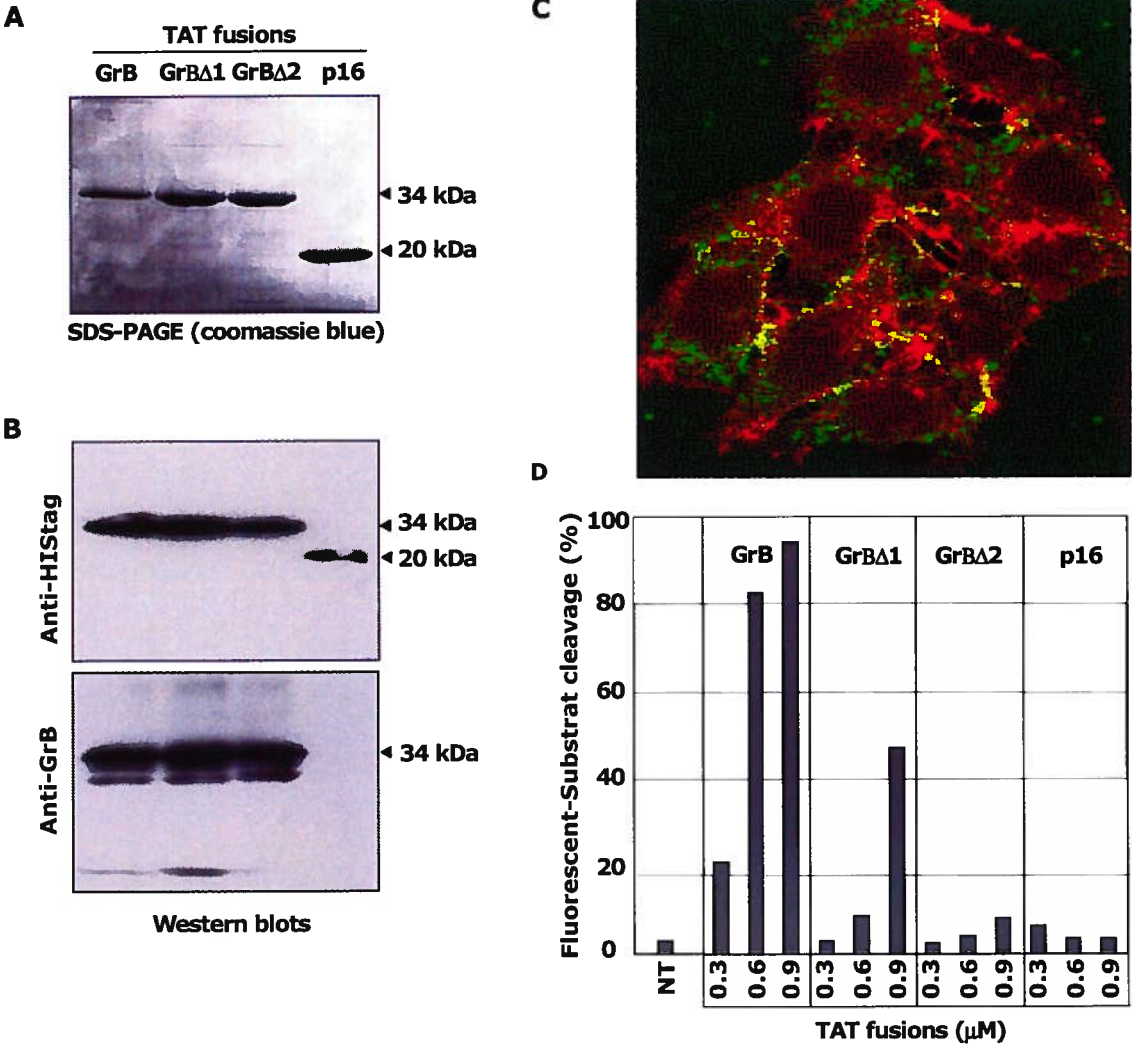


Figure 2

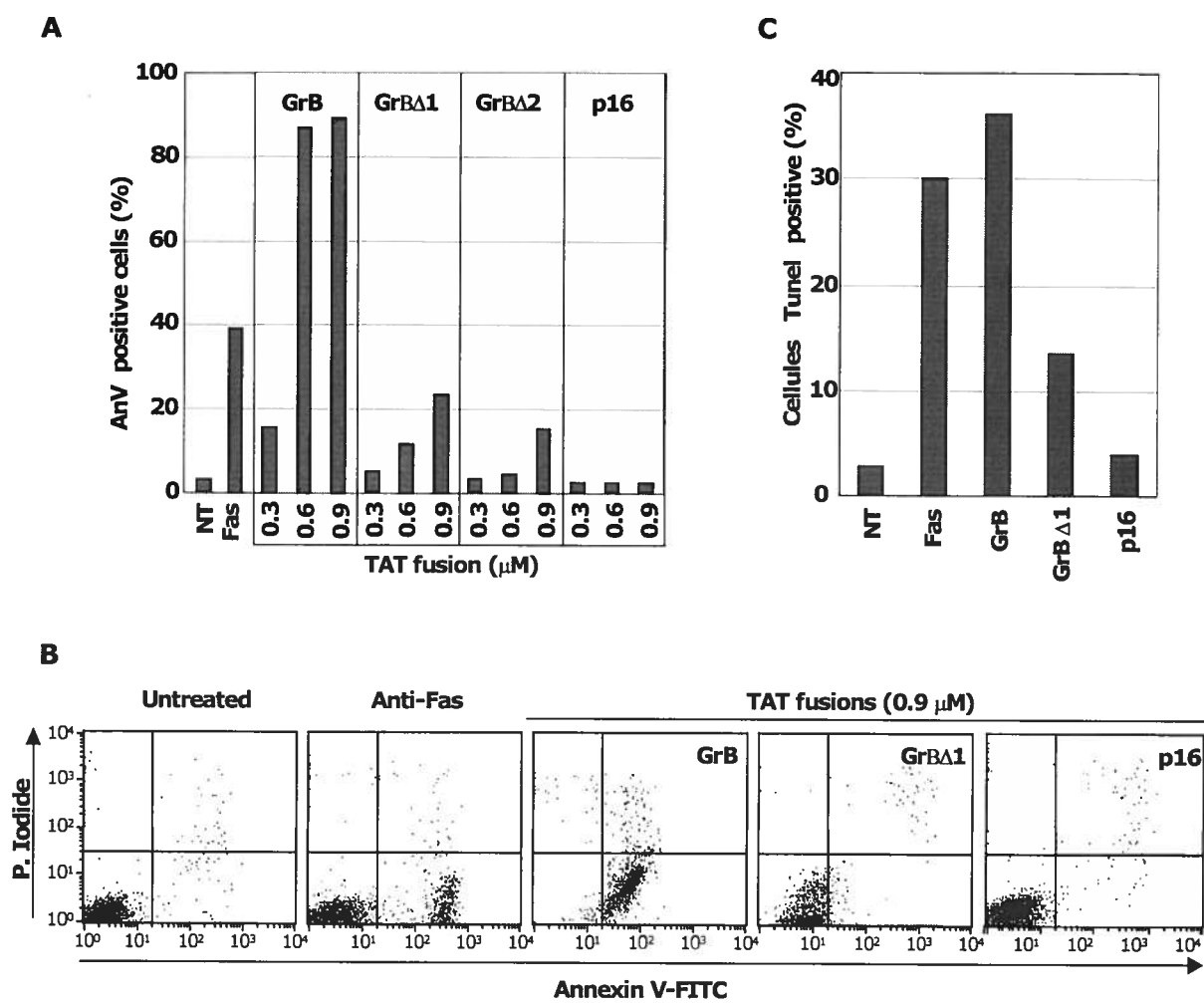


Figure 3

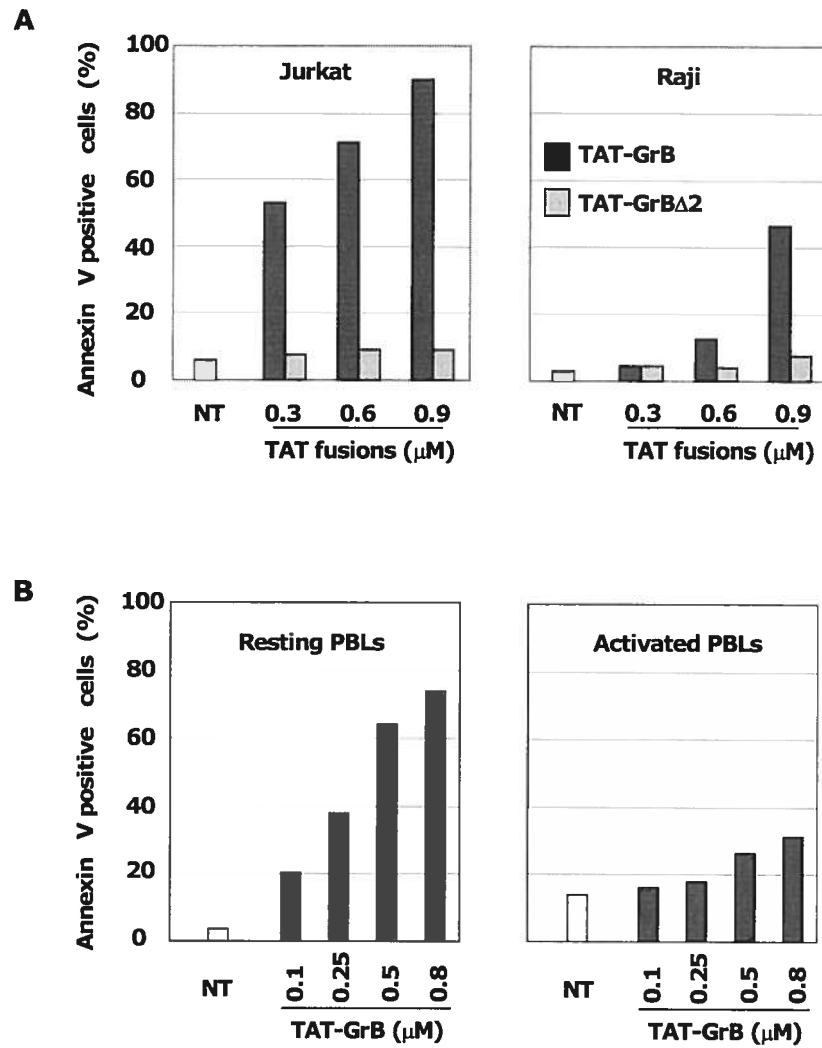
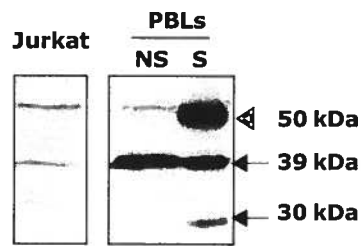
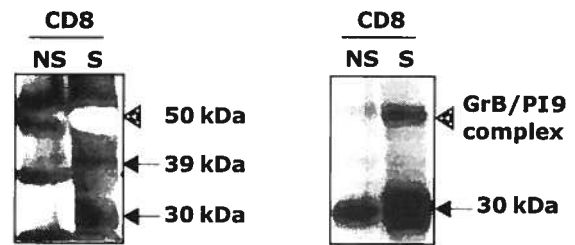
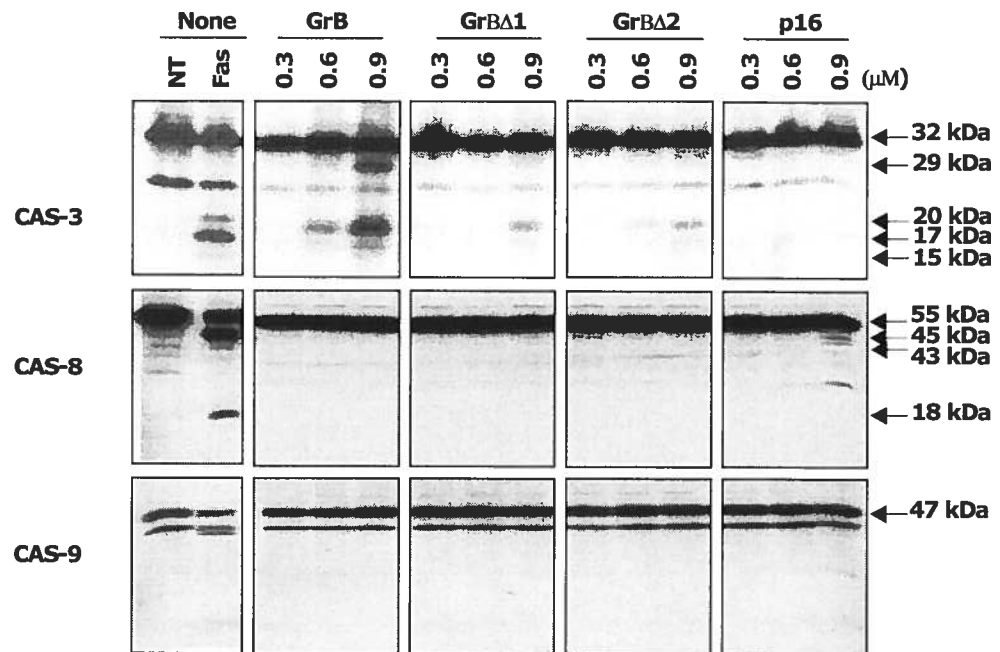
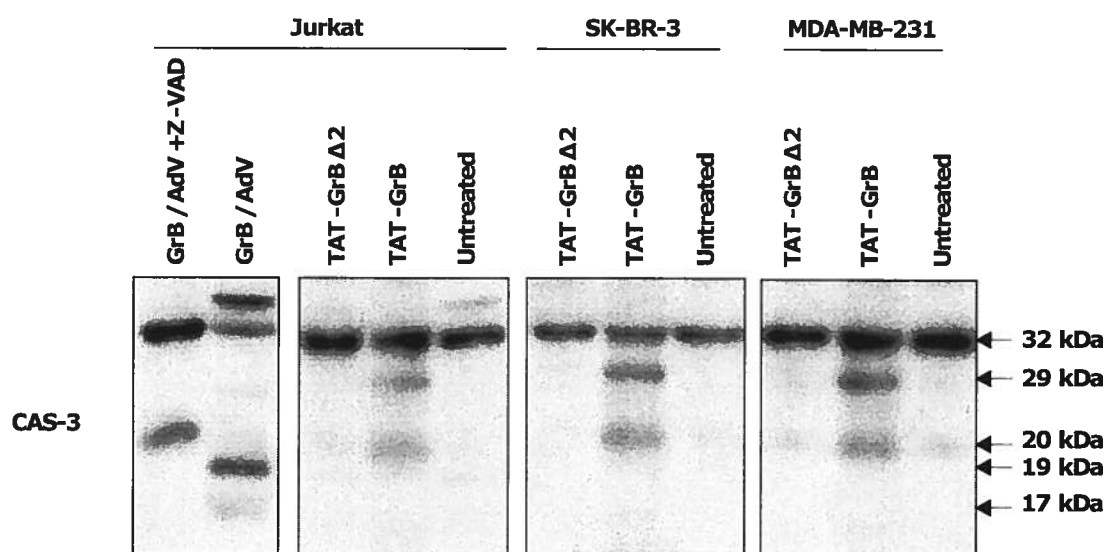


Figure 4

C**Western blot PI9****D****Western blot PI9****Western blot Gr B****Figure 4**

A**Figure 5**

B**Figure 5**

C

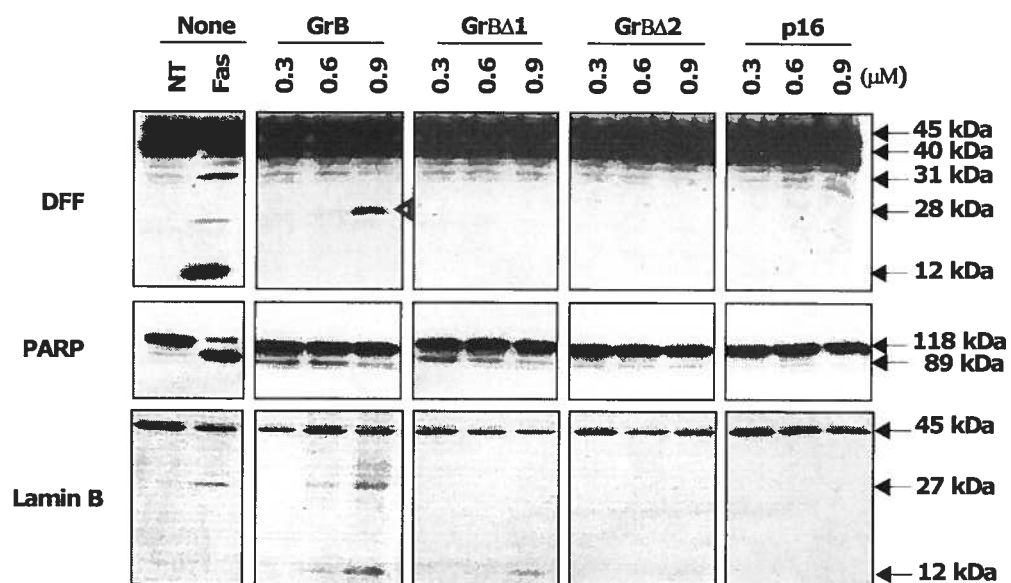


Figure 5

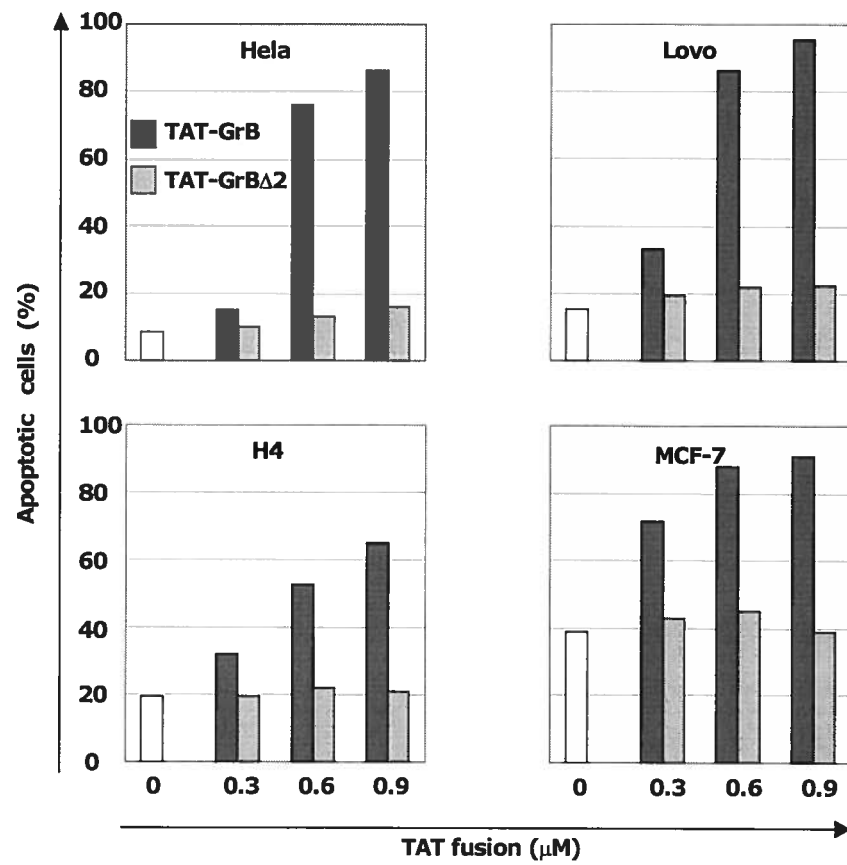


Figure 6

Cell type	Origin	Tissue	Sensitivity to TAT-GrB (% AnV⁺ cells)
1- Jurkat	human	Acute T cell leukemia.....	89,93
2- Molt-3	human	Acute lymphoblastic leukemia.....	90,27
3- L1210	mouse	Lymphocytic leukemia.....	72,81
4- Daudi	human	Burkitt's lymphoma (B lymphoblast).....	61,00
5- K562	human	Chronicmyelogenous leukemia.....	89,15
6- Raji	human	B cell burkitt's lymphoma	46.31
7- Lovo	human	Colorectal adenocarcinoma (colon cancer).....	95,30
8- H4	human	Neuroglioma.....	64,99
9- Hela	human	Adenocarcinoma, cervix.....	86,27
10- MCF-7	human	Adenocarcinoma, mammary gland.....	90,88

Table 1

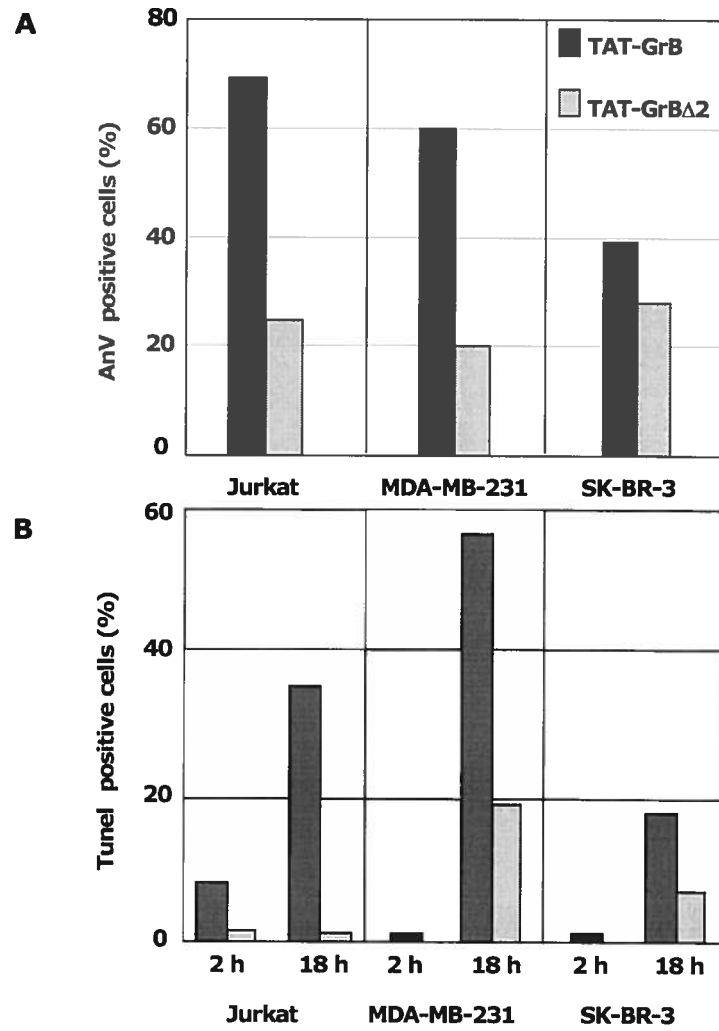


Figure 7

DISCUSSION

La reconnaissance d'une cellule cible infectée ou cancéreuse par un lymphocyte T induit l'activation de ce dernier, son expansion clonale ainsi que sa différenciation en cellule effectrice nécessaire à l'exécution de la réaction immunitaire. Cette réaction se manifeste par l'élimination des cellules cibles par apoptose et emprunte deux voies de mort non exclusives à savoir, la voie des TNFR (DRs) et celle des granules cytotoxiques. Deux familles de protéases, les caspases et les granzymes, sont les principaux exécutants de ces voies d'apoptose. De nombreuses études ont rapporté l'activation de ces protéases dans les lymphocytes T mais cette observation soulignait plutôt le rôle de ces enzymes dans l'élimination des cellules effectrices elles-mêmes par AICD, événement qui survient au terme d'une réponse immune pour maintenir la tolérance du système immunitaire au soi.

Sous cette rubrique, nous exposons les données générées lors de cette thèse qui démontrent l'activation des caspases dans les lymphocytes T immédiatement après la ligation du TCR et dévoilent les mécanismes de cette activation dans cette phase précoce non-apoptotique de la réponse immune. Nous discutons aussi des événements moléculaires, documentés dans la littérature ou suggérés par nos propres travaux, susceptibles de protéger les cellules T de l'activation des caspases et l'induction des granzymes résultant de la réticulation du TCR. Par ailleurs, nous présentons les données biochimiques qui démontrent la nécessité de l'activation des caspases au processus de la prolifération et renseignent des mécanismes potentiels de contribution de ces protéases à un tel processus non-apoptotique. Finalement, nous proposons, à la lumière de nos résultats, quelques mécanismes capables de restituer à ces enzymes leur pouvoir pro-apoptotique à la fin de la réaction immunitaire afin d'assurer l'élimination des lymphocytes T par AICD.

I- Mécanismes d'activation des caspases dans les lymphocytes T non-apoptotiques

L'activation des caspases peut s'effectuer de deux manières possibles. Soit à l'aide d'un dispositif dit intrinsèque car il est déclenché à l'intérieur de la cellule au niveau de la mitochondrie et initié par l'activation de caspase-9, soit via un dispositif extrinsèque déclenché par la ligation des DRs à la surface de la cellule et initié par l'activation de caspase-8. L'analyse de l'état d'activation des caspases (Figure 5B, Article 1) montre que la réticulation du TCR induit le clivage de caspase-3 et caspase-8 alors que cette même ligation ne provoque aucun clivage ou diminution du pro-enzyme de caspase-9 suggérant la contribution du mécanisme extrinsèque (les DRs) à l'activation des caspases résultant de la ligation du TCR.

La contribution des TNF récepteurs à la prolifération des lymphocytes T a été découverte à la fin des années 80 quand le groupe de Lipsky a mis en évidence la capacité du TNF α d'augmenter la prolifération de ces cellules activées via le TCR³⁶⁹. Plus tard, cette faculté d'amplifier la prolifération ou co-stimulation a été attribuée aussi à Fas³⁷⁰. Ces observations ainsi que l'implication du mécanisme extrinsèque dans l'activation des caspases (Figure 5B, Article 1), suggèrent que ce sont les DRs qui déclenchent l'activation de ces protéases lorsqu'ils participent à la co-stimulation des lymphocytes T. Effectivement, nos résultats montrent que l'interférence avec la ligation du TNFR à l'aide d'une chimère TNFR-Fc, au moment de la réticulation du TCR, prévient non seulement la prolifération des cellules T mais inhibe aussi l'activation de caspase-3 dans ces cellules (Figure annexe de l'article 1). Cette constatation a été confirmée par une étude indépendante qui a montré que la co-stimulation des cellules T via Fas induit l'activation de caspase-8³⁷¹.

II- Mécanismes qui protègent les cellules T de l'activité protéolytique des caspases et des granzymes

Le fait que l'apoptose ne survienne pas chez les lymphocytes T activés immédiatement après l'induction des DRs et les granzymes ainsi que l'activation des caspases suggère la présence d'un ou plusieurs mécanismes qui empêchent les lymphocytes T de succomber à leur propre arsenal et de subir une mort précoce par AICD avant d'accomplir leur mission, soit l'élimination des cellules cibles. Les signaux et les co-signaux issus de la réticulation du TCR et de CD28 déclenchent dans les cellules T des voies de signalisation majeures telles que la voie de NF- κ B, celle des PI3Kinases et celle des MAPkinases, qui ont souvent été associées avec l'inhibition de l'apoptose contre une variété de stimuli et ce, dans de nombreux systèmes cellulaires. Les signaux provenant des DRs sont aussi capables d'activer de telles voies et c'est ce qui leur permet, sans doute, de co-stimuler les lymphocytes T et de contrôler l'activité pro-apoptotique qui leur est associée.

1. Mécanismes contrôlant l'activité pro-apoptotique des caspases

1.1. Rôle des voies de signalisation de NF- κ B et des kinases

L'activation de NF- κ B est non seulement nécessaire à l'accomplissement de processus physiologiques tels que le développement, l'expression des gènes impliqués dans l'activation des lymphocytes et la production des cytokines, mais elle semble aussi participer activement à la protection des lymphocytes T contre l'apoptose³⁷². Les analyses génétiques et biochimiques montrent que cette protection de l'apoptose est fondamentalement liée à la capacité de cette voie d'induire l'expression de l'un ou

l'autre des gènes anti-apoptotiques connus. On cite: Bcl-xL, FLIP, cIAP1, cIAP2 et XIAP^{125;154;155;170;373;374}. La corrélation entre l'induction de l'expression de ces inhibiteurs résultant de la réticulation du TCR et la résistance des lymphocytes T à la mort par AICD est présentement bien établie^{125;130;133;170;171;190}.

Les voies de signalisation des kinases peuvent aussi contribuer à la protection des cellules T activées contre l'AICD et ce, à deux niveaux. Au niveau transcriptionnel, ces voies participent à l'induction des gènes anti-apoptotiques et/ou la répression des gènes pro-apoptotiques. Au niveau post-transcriptionnel, elles servent à inhiber les molécules pro-apoptotiques y compris les caspases. Ainsi la capacité de la MAPK, MEK-1, d'inhiber l'apoptose induite par Fas corrèle avec l'augmentation des niveaux de FLIP³⁷⁵. Les MAPK peuvent aussi inhiber l'apoptose induite par Fas en bloquant la dégradation de Bid, un événement nécessaire à la dépolarisation de la mitochondrie et l'exécution de l'apoptose³⁷⁶. La voie PI3K, semble aussi jouer un rôle non négligeable dans la prévention de l'AICD des cellules T activées. En effet, AKT/PKB, la kinase cible de PI3K, peut non seulement induire l'expression de FLIP et Bcl-xL^{377;378}, mais elle peut aussi prévenir l'apoptose en réprimant l'expression des gènes pro-apoptotiques tels que Fas et Bim^{379;380}. Au niveau post-transcriptionnel, AKT peut inhiber l'apoptose en bloquant, les activités pro-apoptotiques de Bad et caspase-9 par phosphorylation^{381;382}.

1.2. Rôle des inhibiteurs des caspases

L'ensemble de ces observations met en évidence la panoplie de facteurs dont la cellule T dispose pour induire l'expression des inhibiteurs des caspases et échapper à l'AICD lors des premiers stades de son activation. Cependant, si le mécanisme d'action à travers lequel ces inhibiteurs préviennent l'AICD réside dans l'inhibition des caspases pourquoi observe-t-on l'activation de ces enzymes dans les lymphocytes T non-apoptotiques?

La majorité des données expérimentales disponibles dans la littérature démontrant l'inhibition de l'apoptose via les DRs découle de l'utilisation d'inhibiteurs artificiels peptidiques ou encore de la surexpression de gènes anti-apoptotiques viraux ou leurs partenaires cellulaires. Ces approches expérimentales aboutissent à des niveaux d'expression qui dépassent de loin ceux rencontrés dans les lignées cellulaires et encore plus ceux atteints lors d'un processus physiologique tel que la ligation du TCR. De tels niveaux sont capables de prévenir le déclenchement de la cascade d'activation à la base, ce qui a mené à l'idée que l'apoptose ne peut être évitée que si la cascade d'activation des caspases soit bloquée complètement. Or, bien que faible le taux d'induction des inhibiteurs cellulaires résultant de la ligation du TCR pourrait être suffisant à prévenir l'apoptose, surtout si l'on considère la variété de gènes et de voies

anti-apoptotiques déclenchés par cette ligation. Par ailleurs, ces facteurs anti-apoptotiques ne semblent pas interférer avec l'activation *per se* des caspases mais plutôt avec l'activité et la fonction de celles-ci une fois déclenchées. C'est ce qui explique le profil restreint et très sélectif de l'activation des caspases et l'absence de dégradation de certains de leurs substrats (Figures 4, 5, 6 et 7, Article 1). Ceci est appuyé par l'observation concernant c-FLIP_L qui, en dépit de son rôle anti-apoptotique, ne semble pas bloquer l'activation de caspase-8. En effet, au moment de son recrutement dans le DISC suite à la ligation de Fas, FLIP forme un hétérodimère avec caspase-8 qui ne prévient pas la première étape d'activation de celle-ci mais bloque sa transition à la forme p18 généralement associée à l'exécution de l'apoptose^{130;131}. Ceci est en parfait accord avec nos résultats (Figures 5A et 5B, Article 1) qui mettent en évidence l'apparition des formes p43/p45 de caspase-8 suite à la réticulation du TCR.

Bcl-2 et ses partenaires anti-apoptotiques semblent plutôt interférer avec les événements mitochondriaux et non pas les caspases elles-mêmes. Ce blocage au niveau de la mitochondrie est capable de prévenir les événements post-mitochondriaux seulement et non pas ceux qui résultent immédiatement de la ligation des DRs. C'est ce qui explique l'absence d'activation de caspase-9 après la réticulation du TCR alors que caspase-8 et caspase-3 ne semblent pas être affectées (Figure 5B, Article 1). Cette constatation est appuyée davantage par nos résultats ainsi que ceux publiés par le groupe de Cohen¹⁷⁶ qui montrent que la surexpression de Bcl-2 dans la lignée lymphocytaire T, Jurkat, inhibe l'apoptose sans bloquer complètement l'activation de caspase-3 (Figure 1, Article 2).

Les IAPs quant à eux, pourraient contribuer à la résistance des cellules T à l'AICD sans interférer avec l'activation des caspases. Ainsi XIAP est capable de séquestrer et d'inhiber les formes déjà actives de caspase-3 et caspase-7^{166;383}. De ce fait, il se peut que les formes matures de ces deux caspases que nous détectons dans les cellules T activées (Figure 8A et 8B, Article 1) soient séquestrées et neutralisées par XIAP. De même, les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 devraient participer à ce contrôle des caspases par XIAP en prévenant la libération dans le cytosol de facteurs apoptogéniques, tels que SMAC/DIABLO, capables de neutraliser l'effet inhibiteur de XIAP¹⁷⁶.

L'ensemble de ces données corrobore l'absence de dégradation de certains substrats de mort tels que DFF-45, RFC140 et Bap-31, malgré l'activation des caspases et explique la résistance des lymphocytes T activés à l'AICD (Figures 6 et 7B et résultats non inclus, Article 1).

2. Mécanismes contrôlant l'activité cytolytique des granzymes

L'activation des lymphocytes T induit une autre série de protéines pro-apoptotiques impliquées dans la voie des granules cytotoxiques telles que PFP, et les granzymes. Tout comme les DRs les granzymes, particulièrement GrB, participent aussi à l'élimination des cellules T par AICD. De ce fait, les lymphocytes T fraîchement activés doivent présenter un mécanisme moléculaire qui les protège de l'activité létale de cette enzyme. Effectivement, nos travaux montrent que les lymphocytes T activés via le TCR présentent une forte résistance à la cytotoxicité de la chimère TAT-GrB alors que les cellules naïves sont sensibles à ce même traitement (Figure 4B, Article 3).

PI9 est un inhibiteur de sérine protéases qui inhibe GrB en s'y associant de façon covalente^{243;384}. Comme c'est le cas pour les inhibiteurs de caspases, la ligation du TCR augmente l'expression de ce gène (Figure 4C, Article 3)²⁴³. Cette augmentation a été proposée aussi comme moyen de protection des cellules T activées contre l'AICD par la voie des granules cytotoxiques. Cependant, cette corrélation était basée seulement sur l'observation de formation de complexes PI9/granzyme B *in vitro* ou dans des lysats de lignées surexprimant cet inhibiteur. Les résultats présentés dans cette thèse montrent non seulement que la formation de ce complexe survient aussi dans les lymphocytes T primaires après ligation du TCR mais ils prouvent aussi que la génération d'un tel complexe est à l'origine de la prévention de l'AICD via granzyme B puisque les lymphocytes T activés présentant ce complexe résistent à de fortes concentrations de la chimère TAT-GrB (Figure 4C et D, Article 3).

III- Contribution des caspases au processus de la prolifération des lymphocytes T induit par la ligation du TCR

L'activation des caspases contribue-t-elle au processus de la prolifération des cellules T lors du déclenchement de la réaction immunitaire? C'est sans doute la principale question qui découle de cette étude. Tenant compte du nombre de publications scientifiques associant ces enzymes exclusivement avec la mort cellulaire programmée il est certes difficile de leur imaginer un rôle physiologique autre que celui du démantèlement des structures cellulaires. Or, le fait que le lymphocyte T permette l'activation de ces enzymes alors qu'il dispose d'une variété de gènes anti-apoptotiques suggère qu'une telle activation puisse lui être physiologiquement rentable.

1. Indices et preuves moléculaires de l'implication des caspases dans la prolifération des cellules T

L'un des indices les plus convaincants soulignant l'implication des caspases dans la prolifération découle de l'observation d'un défaut de prolifération des lymphocytes T provenant des souris déficientes en FADD, celles surexprimant son dominant négatif ou bien les souris transgéniques qui surexpriment Bcl-2^{367;368;385}.

La première évidence moléculaire directe de la participation de ces protéases dans le processus de la prolifération provient des expériences qui démontrent l'incapacité des cellules T de proliférer si elles sont activées en présence d'inhibiteurs spécifiques des caspases (Figure 7A, Article 1)^{366;371}. Etant basée sur un inhibiteur synthétique qui risque de réagir avec d'autres cystéines protéases, cette évidence demandait une confirmation. La figure annexe de l'article 1 montre que l'addition d'un récepteur recombinant TNFR-Fc au moment de la stimulation des cellules T inhibe simultanément leur prolifération et l'activation de caspase-3. Cette observation confirme les données obtenues avec les inhibiteurs peptidiques et montre que la co-stimulation via TNFR et l'activation des caspases sont deux événements indissociables dans le processus d'activation des lymphocytes T.

L'inhibition de la prolifération observée dans les lymphocytes déficients en FADD a fait de caspase-8 un candidat de choix dans la recherche de l'implication des caspases dans l'activation des cellules T. Une première tentative dans ce sens a été effectuée sur les souris transgéniques surexprimant l'inhibiteur viral de caspase-8, CrmA³⁶⁸. Cependant, les cellules T provenant de ces souris répondaient normalement à la ligation du TCR. La discussion sur la réelle implication des caspases dans ce contexte non-apoptotique aurait pu être close après cette observation si d'autres preuves d'ordre génétique n'ont pas été fournies. En effet, l'équipe de Lenardo a découvert que le défaut dans l'activation des lymphocytes T, B et les NKs observé chez certains patients ALPS immunodéficients était associé à une mutation inactivant caspase-8³⁸⁶. En dépit de son contenu en faveur de l'implication des caspases dans le processus de prolifération, cette découverte demeurait statistiquement faible puisqu'elle était basée sur deux patients seulement. Une année plus tard, le groupe de Hakem a présenté une preuve génétique irréfutable quant à l'implication des caspases dans la prolifération des cellules T³⁸⁷. En effet, ces chercheurs ont montré que la délétion de caspase-8 ciblant les lymphocytes T chez la souris est non seulement capable de réduire le nombre de ces cellules mais elle bloque leur prolifération issue de la réticulation du TCR. De plus ces souris étaient incapables de déployer une réponse CTL efficace contre certaines infections virales³⁸⁷.

2. Mécanismes potentiels de contribution des caspases à la prolifération

Les voies de signalisation empruntées par les caspases pour mener à la prolifération ne sont pas encore élucidées. A présent on ne dispose que de peu d'informations issues des études indépendantes et dont les objectifs sont loin d'être communs. Or, les données concernant l'implication de l'activité protéolytique des caspases dans certains processus non-apoptotiques indiquent les mécanismes potentiels de contribution de ces enzymes à la prolifération des lymphocytes T.

2.1.a. Implication des caspases dans l'activation des voies transcriptionnelles: NF- κ B et MAPK

La ligation des DRs peut assurer la co-stimulation des cellules T en activant diverses voies telles que NF- κ B, la voie des MAPK et celle des JNK³⁸⁸. La connexion des DRs avec ces voies est assurée par les molécules adaptatrices, TRAFs et RIP, dans le cas de TNFR et FLIP dans celui de Fas. Or l'apport des caspases, particulièrement caspase-8, au déclenchement de ces voies de survie demeurerait inconnu. L'arrêt de la prolifération des cellules T sous l'effet des inhibiteurs des caspases ou de la chimère TNFR-Fc (Figure 7A et figure de l'annexe, Article 1), suggérait que la contribution des caspases à la prolifération réside dans leur capacité d'activer l'une ou l'autre de ces deux voies de signalisation. Cependant, les études qui se sont intéressées à cette question ont montré que l'activation NF- κ B ou celle des MAPK demeure intacte chez les souris déficientes en caspase-8 ou surexprimant FADD en dépit du défaut de prolifération que leurs lymphocytes présentent^{368;387}. Ceci suggère que les caspases mobilisent d'autres moyens moléculaires qui leur permettent de contribuer à la prolifération de ces cellules.

2.1.b. Implication des caspases dans la production de cytokines

Il faut d'abord rappeler que l'activité protéolytique des caspases ne mène pas inéluctablement à l'inactivation de leurs substrats. Ainsi le premier membre de cette famille de protéases, caspase-1, a été identifié à la base comme enzyme pro-inflammatoire qui sert à la maturation de cytokines telles que l'IL-1 β et l'IL-18^{85;86;389;390}. Les souris déficientes en caspase-1 ne présentent pas seulement un défaut de production de l'IL-1 β et l'IL-18 mais leurs cellules sont incapables de produire d'autres cytokines comme TNF α , interféron γ (IFN γ) IL-1 α et IL-6^{391;392}. Les souris caspase-11^{-/-} ont un phénotype similaire car elles présentent le même défaut de production de l'IL-1 β et l'IL-18³⁹³. Une étude récente a révélé la nécessité d'une activité caspase-3 (DEVDase) à la maturation et la sécrétion de l'IL-16, cytokine qui participe dans le chimiotactisme des cellules lymphatiques et leur recrutement aux

sites d'inflammation³⁹⁴. De même, les cellules T provenant des patients ALPS, présentant une mutation inactivant caspase-8, ne produisent pas d'IL-2. Ceci suggère la production de cette cytokine de croissance comme mécanisme de contribution des caspases à la prolifération³⁸⁶. Cependant, les lymphocytes T provenant des souris déficientes en caspase-8 présentant le même défaut de prolifération semblent produire de l'IL-2, quoique à des niveaux modestes³⁸⁷. Bien qu'elles suggèrent que la contribution des caspases à la prolifération soit indépendante de la production de l'IL-2 cette observation ne peut écarter la possibilité d'un rôle de ces protéases dans la sensibilisation des lymphocytes à cette cytokine. D'ailleurs, l'addition de l'IL-2 au moment de la stimulation des cellules T déficientes en caspase-8 n'était pas capable de résoudre leur défaut de prolifération³⁸⁷, une situation que nous avons réalisée plutôt avec l'incapacité de l'IL-2 recombinant à restaurer totalement la prolifération des cellules T stimulées en présence de la chimère TNFR-Fc (Résultat non inclus dans l'annexe de l'article 1). Ces données suggèrent la participation des caspases dans la production et la signalisation des cytokines comme moyen de contribution à la prolifération des lymphocytes T.

2.1.c. Implication des caspases dans la restructuration cellulaire lors de la mitose

A l'instar de l'apoptose, la mitose se caractérise par la condensation de la chromatine et la dispersion de la membrane nucléaire⁸. Ces similitudes morphologiques reflètent l'existence de mécanismes communs en dépit des bilans physiologiques opposés de ces deux phénomènes. Ainsi le remodelage considérable que subit la cellule pendant sa division requiert certainement la réorganisation du cytosquelette issue du désassemblage des protéines telles que l'actine, les lamines, la gelsoline et la fodrine. De ce point de vue, la contribution d'une ou plusieurs activités caspases ne serait pas illogique surtout si l'on considère le fait que les quatre protéines structurales citées ci-dessus sont de parfaits substrats des caspases^{13;111}. Par conséquent, l'absence de prolifération des cellules T issue de l'inhibition des caspases pourrait résulter d'un blocage du cytosquelette due au manque de dégradation, par les caspases, de l'une ou l'autre des protéines structurales. D'ailleurs, le défaut d'activation des lymphocytes T observé chez les patients atteints du syndrome WAS (Wiskott-Aldrich syndrome), une immunodéficiência humaine liée au chromosome X, résulte de la mutation du gène WASP impliqué dans la dépolymérisation de l'actine nécessaire à la réorganisation du cytosquelette lors de la division cellulaire³⁹⁵. De ce fait, la dégradation de lamine B que nous observons lors de la prolifération des

lymphocytes T (Figure 7A, Article 1) serait probablement nécessaire à la réorganisation de la structure nucléaire lors de la division de ces cellules.

2.1.d. Implication des caspases dans le cycle cellulaire

L'appartenance de certains facteurs du cycle cellulaire à la liste des substrats des caspases indique l'implication de ces protéases dans la régulation de ce processus physiologique. Bien qu'on ne lui connaisse encore aucun rôle dans l'apoptose, l'activation des cdk (cyclin dependent kinases) telles que cdc2 et cdk2 a été observée dans une variété de traitements apoptotiques y compris la ligation de Fas et l'apoptose induite par granzyme B³⁹⁶⁻³⁹⁸. Cette activation résulte de la dégradation, caspase dépendante, de certains inhibiteurs du cycle cellulaire tels que p21^{CIP}, p27^{KIP}, cdc27 (APC1) et Wee-1^{397;399}. Ces données nous amènent à penser que l'activation des caspases résultant de la co-stimulation des DRs pourrait contribuer à la prolifération à travers la dégradation d'un ou plusieurs inhibiteurs du cycle cellulaire. Effectivement, nos travaux montrent que la réticulation du TCR induit la dégradation de Wee-1 dans les cellules T (Figure 7A, Article 1), un événement suffisant à l'activation des cdk. Les caspases peuvent agir aussi au niveau transcriptionnel pour réguler le cycle cellulaire. Ainsi une étude récente a montré que l'inhibition d'une activité VEIDase associée à caspase-6 bloque la prolifération induite chez les lymphocytes B par la ligation de CD40⁴⁰⁰. Ce blocage a été attribué à l'arrêt du cycle cellulaire résultant de l'élévation du niveau de p27^{KIP} et la répression de l'expression de trois régulateurs positifs du cycle cellulaire, cyclin D2, cyclin D3 et cdk4.

Dans ce contexte de la régulation du cycle cellulaire, les caspases pourraient ne pas agir forcément dans le sens de la prolifération. Elles pourraient aussi réguler négativement le cycle cellulaire sans, pour autant, mener à l'apoptose. Le groupe de Tak Mak a montré que les lymphocytes B provenant des souris déficientes en caspase-3 présentent un excès de prolifération qui résulte d'une élévation de leur cycle cellulaire plutôt que d'un défaut d'apoptose⁴⁰¹. Cette perte de contrôle du cycle serait causée par le maintien de l'interaction entre p21^{CIP} et PCNA, complexe activateur du cycle qui est normalement dissocié par dégradation de p21 en présence de caspase-3.

Ces observations suggèrent que l'activation des caspases serait non seulement nécessaire au processus de la prolifération mais elle servirait aussi à contrôler cette dernière en surveillant la division cellulaire afin de prévenir le développement de lymphoprolifération et l'auto-immunité qui peut en découler.

IV- Mécanismes susceptibles de diriger l'activité protéolytique des caspases vers l'exécution de l'AICD

Le nombre de mécanismes moléculaires qui confèrent la résistance à l'AICD des cellules T n'a cessé de croître au fur et à mesure de l'identification de nouveaux inhibiteurs physiologiques des caspases. A présent, le consensus mise sur le retour de l'expression de ces gènes à son niveau basal au terme de réaction immunitaire comme moyen de sensibilisation des lymphocytes T à l'AICD. Cependant, cette baisse d'expression ne peut suffire à expliquer la prédisposition à l'AICD surtout si l'on considère le débat concernant la pertinence de l'implication de certains inhibiteurs comme c'est le cas pour les membres de la famille Bcl-2. De ce fait, nous exploitons les données générées lors de cette thèse ainsi que les travaux publiés dans la littérature pour proposer quelques mécanismes potentiels capables de polariser l'activité protéolytique des caspases vers l'exécution de l'AICD.

1. Mobilisation différentielle des DRs

L'un des mécanismes susceptibles d'orienter l'activation des caspases vers l'apoptose serait la mobilisation, par les lymphocytes T activés, d'un DR différent de celui qui a servi à leur co-stimulation au moment de la ligation du TCR.

L'utilisation d'une des méthodes génomiques (Gene expression array) lors du criblage des gènes susceptibles de jouer un rôle précoce dans l'activation des cellules T a montré que la ligation du TCR porte les niveaux de TNF α à 23 fois le niveau basal et 91 fois après co-stimulation via CD28 alors que le niveau de Fas-L atteint seulement 2.7 fois le niveau basal et ce, même après co-stimulation de CD28¹⁷⁰. Ces données suggèrent que dans le processus d'une réaction immunitaire, le TNFR intervient plus tôt pour co-stimuler les lymphocytes T alors que Fas est mobilisé au terme de la réaction pour éliminer ces même cellules. Cette hypothèse n'exclut pas une implication de TNFR dans l'AICD puisque certaines études ont souligné la contribution de ce récepteur à ce processus²⁷⁹. Or cet apport semble minime car il touche seulement une fraction des lymphocytes CD8 alors que Fas semble participer à l'élimination des populations CD4 et CD8 des lymphocytes T. C'est ce qui explique le développement de lymphoprolifération seulement dans le cas de déficience du système Fas/Fas-L chez les souris *lpr* et *gld* ou chez les patients ALPS et non pas celui des autres DRs y compris TNFR^{277;333;334}.

La signalisation intracellulaire des DRs semble aussi soutenir cette mobilisation différentielle de TNFR et Fas dans les différentes phases de la réponse immune. Ainsi au contraire de la signalisation de Fas où l'activation de caspase-8 se fait directement via FADD (Figure 4; Article 2)^{51;57}, l'activation de cette caspase suite à la ligation du

TNFR requiert le recrutement préalable de TRADD⁵⁴. Or, cette molécule adaptatrice compte d'autres partenaires moléculaires tels que RIP et les TRAFs capables d'activer NF- κ B et de biaiser le signal provenant du TNFR vers la survie des cellules T^{53;69}. Récemment, une étude menée par l'équipe de Tschopp a réussi à mettre en évidence la priorité du recrutement de TRAF et de RIP ainsi que l'activation de la voie de NF- κ B sur l'initiation de la cascade protéolytique des caspases dans la signalisation du TNFR⁴⁰². Ce délai dans l'activation des caspases devrait permettre aux lymphocytes T d'induire les mécanismes anti-apoptotiques via l'activation de NF- κ B afin de mieux contrôler l'activité protéolytique des caspases déclenchée plus tard par le même récepteur. Une telle avance de la voie anti-apoptotique de NF- κ B risque d'être absente dans la signalisation de Fas puisque ce dernier n'interagit pas avec TRADD et semble activer NF- κ B via FADD au même titre que les caspases.

L'ensemble de ces données suggère la mobilisation de deux DRs dans deux phases distinctes du processus d'activation des lymphocytes T et favorise l'idée du transfert de signalisation du récepteur TNFR à Fas comme moyen d'élimination des lymphocytes T par AICD.

2. Redistribution sub-cellulaire des caspases

Si la protection des cellules T contre l'AICD résultait seulement de la mobilisation d'un DR autre que Fas à cause de la faible induction de Fas L alors la réticulation de Fas sur les lymphocytes T fraîchement activés devrait induire l'apoptose de ces cellules. Or, l'oligomérisation de ce récepteur à l'aide d'anticorps spécifiques est incapable de vaincre la résistance des cellules T activées et d'induire leur apoptose⁴⁰³. Ceci suggère la participation d'autres facteurs moléculaires qui agissent probablement de concert avec la mobilisation différentielle des DRs pour polariser l'activation des caspases vers l'exécution de l'AICD.

Les résultats présentés dans cette thèse suggèrent un mécanisme supplémentaire susceptible d'orienter les signaux des DRs vers la co-stimulation ou l'apoptose des lymphocytes T: la distribution différentielle des caspases dans les compartiments de signalisation de la membrane plasmique, les rafts. L'analyse de la distribution sub-cellulaire des éléments de la signalisation des DRs dans la lignée lymphocytaire T Jurkat a montré que certaines molécules comme FADD, FLIP et caspase-8 sont constitutivement localisées dans les rafts et que la ligation de Fas ne fait qu'augmenter leur association avec ce compartiment membranaire (Figures 2B et 3; Article 2). D'autre part, caspase-3 et caspase-7 figurent aussi parmi les molécules associées aux rafts (Figures 2B et 3; Article 2). Ceci indique que ces caspases, exclusivement associées avec l'exécution de l'apoptose, peuvent aussi participer à

l'initiation des messages de mort issus de Fas. La preuve de la participation de caspase-3 à l'initiation de l'apoptose via Fas provient de la pré-association de cette protéase avec le DISC de Fas et l'effet inhibiteur qu'exerce son blocage sur l'activation de caspase-8 et l'induction de l'apoptose (Figures 4 et 6C, Article 2). Toutefois, l'analyse des rafts provenant des lymphocytes T primaires naïfs ou activés via le TCR a montré que la teneur de ces compartiments en caspase-3 est très faible (Figures 2C et 2D, Article 2). Cette faible association de caspase-3 avec la membrane plasmique des lymphocytes T activés rappelle l'incapacité des cellules T primaires activées à former un DISC suite à la réticulation de Fas^{62;190} et pourrait expliquer la résistance de ces cellules à l'AICD à ce stade de leur activation.

Ces résultats permettent de proposer la relocalisation des caspases, particulièrement celle de caspase-3, à la membrane plasmique parmi les événements qui prédisposent les cellules T activées à l'exécution de l'AICD via Fas ou les autres DRs.

V- Conclusion générale

Les travaux présentés dans cette thèse démontrent que la mobilisation des caspases par les lymphocytes T dépasse le cadre de l'élimination de ces cellules par AICD au terme de la réponse immune. Ces travaux montrent que la réticulation du TCR induit l'activation des caspases sans induire l'apoptose des lymphocytes T et soulignent la contribution des DRs, fort probablement TNFR, à cette activation. D'autre part, nos données révèlent le profil altéré de l'activation de ces enzymes et l'intégrité de certains substrats, cruciaux à l'apoptose, comme mécanisme moléculaire de l'absence de l'AICD. Ce qui corrobore le concept courant du déclenchement de mécanismes anti-apoptotiques dans les lymphocytes T activés. Dans ce même thème, nos travaux ont mis en évidence et ce, dans les cellules T primaires, la formation d'un complexe covalent entre GrB et son inhibiteur physiologique, PI9, et ont démontré la contribution d'un tel complexe à la résistance des cellules T à l'AICD via la voie des granules cytotoxiques. En outre, l'incapacité de dissocier la prolifération des cellules T de l'activation des caspases a révélé la contribution majeure de cette famille de protéases au processus de la prolifération de ces cellules. Finalement, les données obtenues avec la lignée lymphocytaire T Jurkat, suggèrent la redistribution des caspases dans les rafts et leur pré-association avec le DISC, au terme de la réaction immunitaire, comme dispositif moléculaire de prédisposition des cellules T primaires à l'AICD.

L'ensemble de ces données nous a permis de proposer un modèle reconstituant les événements moléculaires qui déclenchent l'activation des caspases, contrôlent leur activité protéolytique et dirigent celle-ci vers la prolifération ou l'AICD des cellules T

(Figure 7). Ainsi la réticulation du TCR mène à l'activation des lymphocytes T et l'expression de certains éléments des deux voies d'apoptose, tels que les TNFRs et leurs ligands ainsi que GrB. Suite à leur induction, les TNFRs co-stimulent les lymphocytes T et déclenchent l'activation des caspases qui participent activement à ce processus de co-stimulation. A cette étape de la réaction immunitaire, l'activation des caspases et l'induction de GrB ne provoque pas l'apoptose des cellules T car la co-stimulation induit l'expression d'une série de molécules anti-apoptotiques qui interviennent à différents niveaux de signalisation pour contrôler l'activité cytotolytique de ces protéases. Plus tard dans le processus d'activation de ces cellules, on assiste à une forte redistribution dans les rafts des éléments de signalisation des DRs incluant caspase-3. Cette redistribution amplifie l'initiation des signaux des DRs car elle favorise le recrutement immédiat des molécules de signalisation, particulièrement caspase-3, dans le DISC. L'intensité de ce signal provenant du DISC combinée avec la baisse du niveau d'expression des facteurs anti-apoptotiques sensibilise les lymphocytes T à la ligation des DRs et les prédispose à l'exécution l'AICD.

En perspective et à la lumière de ces nouvelles données, nous proposons d'adresser certains points que nous jugeons cruciaux à la dissection de la double implication de ces enzymes dans deux activités paradoxales de la défense immunitaire: l'expansion des lymphocytes T et leur contraction par AICD.

1. Déterminer le mécanisme moléculaire de la sélectivité d'activation des caspases et la dégradation de leurs substrats lors de la prolifération des cellules T

Les données publiées dans la littérature proposent l'induction des inhibiteurs physiologiques des caspases comme mécanisme de protection des cellules T contre l'AICD. Ce concept est en accord avec le profil restreint de l'activation des caspases et l'absence de dégradation de certains de leurs substrats. Cependant, ces deux faits demeurent corrélatifs. De ce fait, les expériences futures devraient confirmer cette corrélation afin d'éviter le risque de sous-estimer d'autres mécanismes de protection comme la localisation ou la séquestration des caspases loin de leurs substrats cruciaux lors de cette phase non-apoptotique. A cette fin, il faudrait procéder à l'immunoprécipitation depuis les cellules T activées de certaines caspases telles que caspase-3, caspase-7, caspase-8 et caspase-9, et analyser leur interaction avec l'un ou l'autre des inhibiteurs physiologiques à l'aide de western blots. De même, il faudrait confirmer l'apport d'une telle interaction à la résistance des cellules T à l'AICD et ce, en interférant avec l'expression de ces inhibiteurs à l'aide de la technique de siRNA.

2. Déterminer le ou les événements moléculaires qui permettent à ces enzymes de contribuer à la prolifération

Les données moléculaires issues de l'examen des souris transgéniques surexprimant FADD ou déficientes en caspase-8 qui ont confirmé la nécessité des caspases à la prolifération ont réussi à écarter deux des meilleurs mécanismes candidats, à savoir l'activation de NF- κ B et celles des MAPK^{368;387}. Ceci incite à l'exploration d'autres voies de contribution des caspases à la prolifération. Tenant compte de l'activité protéolytique des caspases, ce point devrait être abordé en étendant l'analyse comparative des profils de dégradation des substrats des caspases lors de l'activation et l'apoptose des lymphocytes T primaires. La dégradation, au cours de la prolifération, et le rôle dans la division cellulaire de certains facteurs comme lamine B et Wee-1 font des protéines structurales et les régulateurs négatifs du cycle cellulaire de bons candidats de départ dans cette analyse. Les nouvelles méthodes protéomiques comme le "Power blot" capables de cribler simultanément une multitude de protéines seraient un instrument de choix à l'accomplissement d'une telle analyse.

3. Déterminer le mécanisme qui polarise l'activité protéolytique des caspases vers l'apoptose

Lors de la discussion des travaux de cette thèse, nous avons suggéré quelques mécanismes capables de participer, avec la répression des inhibiteurs des caspases, à l'orientation de l'activité protéolytique des caspases vers l'apoptose. Parmi ces mécanismes, nous soupçonnons l'augmentation de la proportion de certaines caspases dans les compartiments lipidiques de la membrane plasmique. De ce fait, nous proposons d'examiner l'association de ces caspases avec les rafts et la dynamique de cette association suite à des stimuli menant à l'activation ou l'apoptose des lymphocytes T primaires.

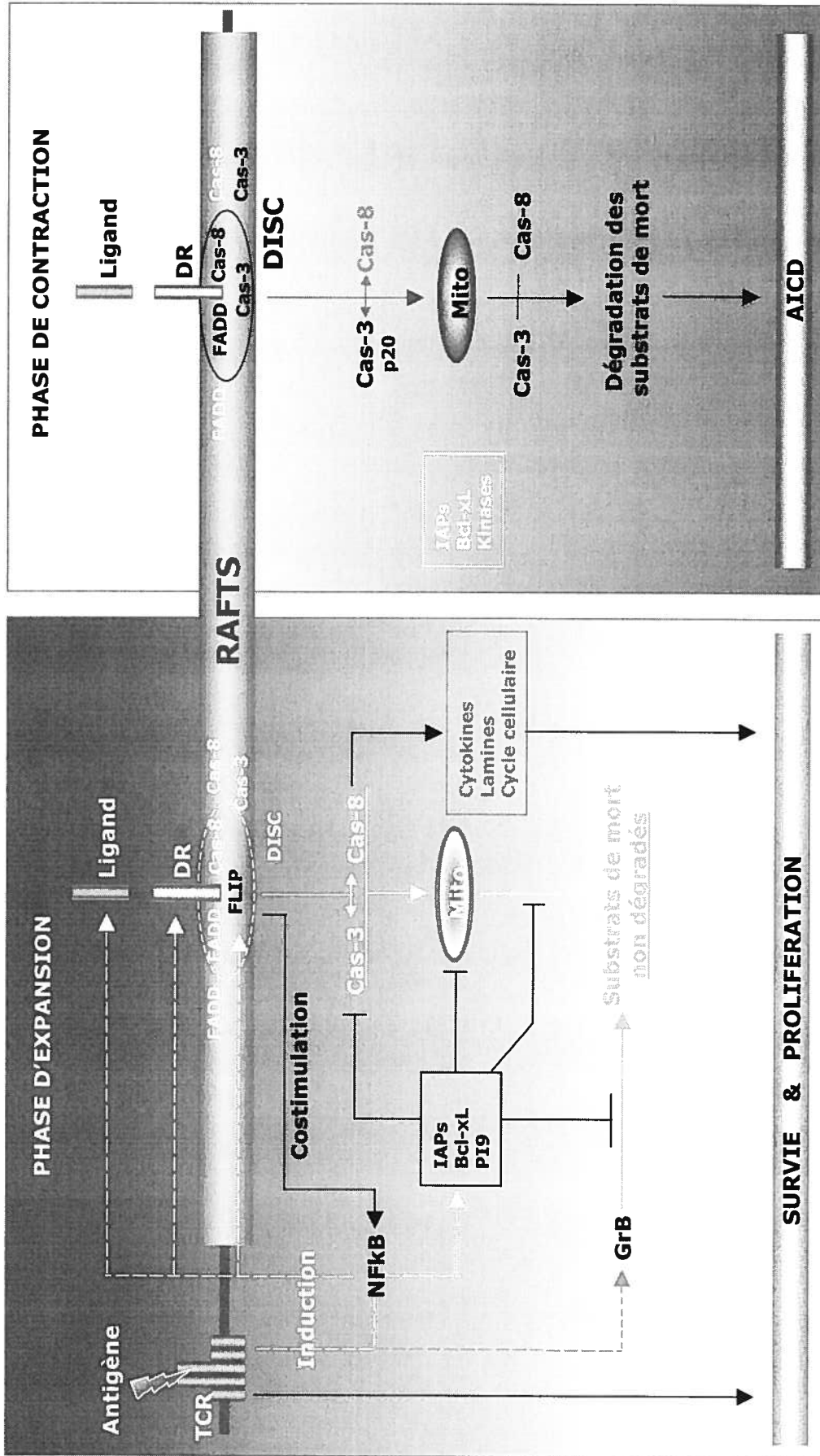


Figure 7. Mécanismes potentiels qui dirigent l'activité protéolytique des caspases vers la prolifération ou l'exécution de l'AICD des lymphocytes T: Rôle des facteurs anti-apoptotiques et de la distribution sub-cellulaire des caspases dans la modulation de leur activité protéolytique et sa polarisation vers la survie ou la mort des cellules T activées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lenardo, M.J. 1997. The molecular regulation of lymphocyte apoptosis. *Semin.Immunol.* 9:1-5.
2. Shresta, S., C.T.Pham, D.A.Thomas, T.A.Graubert, and T.J.Ley. 1998. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr.Opin.Immunol.* 10:581-587.
3. Kagi, D., B.Ledermann, K.Burki, R.M.Zinkernagel, and H.Hengartner. 1996. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu.Rev.Immunol.* 14:207-232.
4. Russell, J.H. and T.J.Ley. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu.Rev.Immunol.* 20:323-370.
5. Jacobson, M.D., M.Weil, and M.C.Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-354.
6. Kerr, J.F., A.H.Wyllie, and A.R.Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 26:239-257.
7. Rathmell, J.C. and C.B.Thompson. 1999. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu.Rev.Immunol.* 17:781-828.
8. Wyllie, A.H., J.F.Kerr, and A.R.Currie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int.Rev.Cytol.* 68:251-306.
9. Ellis, R.E., J.Y.Yuan, and H.R.Horvitz. 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annu.Rev.Cell Biol.* 7:663-698.
10. Chinnaiyan, A.M. and V.M.Dixit. 1996. The cell-death machine. *Curr.Biol.* 6:555-562.
11. Takahashi, A., E.S.Alnemri, Y.A.Lazebnik, T.Fernandes-Alnemri, G.Litwack, R.D.Moir, R.D.Goldman, G.G.Poirier, S.H.Kaufmann, and W.C.Earnshaw. 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.

12. Orth, K., A.M.Chinnaiyan, M.Garg, C.J.Froelich, and V.M.Dixit. 1996. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J.Biol.Chem.* 271:16443-16446.
13. Rao, L., D.Perez, and E.White. 1996. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J.Cell Biol.* 135:1441-1455.
14. Hirata, H., A.Takahashi, S.Kobayashi, S.Yonehara, H.Sawai, T.Okazaki, K.Yamamoto, and M.Sasada. 1998. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J.Exp.Med.* 187:587-600.
15. Casiano, C.A., S.J.Martin, D.R.Green, and E.M.Tan. 1996. Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis. *J.Exp.Med.* 184:765-770.
16. Brancolini, C., D.Lazarevic, J.Rodriguez, and C.Schneider. 1997. Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of beta-catenin. *J.Cell Biol.* 139:759-771.
17. Zamzami, N., P.Marchetti, M.Castedo, D.Decaudin, A.Macho, T.Hirsch, S.A.Susin, P.X.Petit, B.Mignotte, and G.Kroemer. 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J.Exp.Med.* 182:367-377.
18. Zamzami, N., P.Marchetti, M.Castedo, C.Zanin, J.L.Vayssiere, P.X.Petit, and G.Kroemer. 1995. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J.Exp.Med.* 181:1661-1672.
19. Kroemer, G., N.Zamzami, and S.A.Susin. 1997. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol.Today* 18:44-51.
20. Kluck, R.M., E.Bossy-Wetzel, D.R.Green, and D.D.Newmeyer. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132-1136.
21. Yang, J., X.Liu, K.Bhalla, C.N.Kim, A.M.Ibrado, J.Cai, T.I.Peng, D.P.Jones, and X.Wang. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275:1129-1132.

22. Fadok,V.A., D.L.Bratton, S.C.Frasch, M.L.Warner, and P.M.Henson. 1998. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death.Differ.* 5:551-562.
23. Ashkenazi,A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat.Rev.Cancer* 2:420-430.
24. Carswell,E.A., L.J.Old, R.L.Kassel, S.Green, N.Fiore, and B.Williamson. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 72:3666-3670.
25. Pennica,D., G.E.Nedwin, J.S.Hayflick, P.H.Seeburg, R.Derynck, M.A.Palladino, W.J.Kohr, B.B.Aggarwal, and D.V.Goeddel. 1984. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312:724-729.
26. Gray,P.W., B.B.Aggarwal, C.V.Benton, T.S.Bringman, W.J.Henzel, J.A.Jarrett, D.W.Leung, B.Moffat, P.Ng, L.P.Svedersky, and . 1984. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* 312:721-724.
27. Locksley,R.M., N.Killeen, and M.J.Lenardo. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487-501.
28. Idriss,H.T. and J.H.Naismith. 2000. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc.Res.Tech.* 50:184-195.
29. Chan,F.K., H.J.Chun, L.Zheng, R.M.Siegel, K.L.Bui, and M.J.Lenardo. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288:2351-2354.
30. Siegel,R.M., J.K.Frederiksen, D.A.Zacharias, F.K.Chan, M.Johnson, D.Lynch, R.Y.Tsien, and M.J.Lenardo. 2000. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288:2354-2357.
31. Gruss,H.J. and S.K.Dower. 1995. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85:3378-3404.

32. Kong, Y.Y., H. Yoshida, I. Sarosi, H.L. Tan, E. Timms, C. Capparelli, S. Morony, A.J. Oliveira-dos-Santos, G. Van, A. Itie, W. Khoo, A. Wakeham, C.R. Dunstan, D.L. Lacey, T.W. Mak, W.J. Boyle, and J.M. Penninger. 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397:315-323.
33. Monreal, A.W., B.M. Ferguson, D.J. Headon, S.L. Street, P.A. Overbeek, and J. Zonana. 1999. Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Nat. Genet.* 22:366-369.
34. Fata, J.E., Y.Y. Kong, J. Li, T. Sasaki, J. Irie-Sasaki, R.A. Moorehead, R. Elliott, S. Scully, E.B. Voura, D.L. Lacey, W.J. Boyle, R. Khokha, and J.M. Penninger. 2000. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 103:41-50.
35. Sheridan, J.P., S.A. Marsters, R.M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C.L. Gray, K. Baker, W.I. Wood, A.D. Goddard, P. Godowski, and A. Ashkenazi. 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277:818-821.
36. Pan, G., J. Ni, Y.F. Wei, G. Yu, R. Gentz, and V.M. Dixit. 1997. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277:815-818.
37. Marsters, S.A., J.P. Sheridan, R.M. Pitti, A. Huang, M. Skubatch, D. Baldwin, J. Yuan, A. Gurney, A.D. Goddard, P. Godowski, and A. Ashkenazi. 1997. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr. Biol.* 7:1003-1006.
38. Degli-Esposti, M.A., P.J. Smolak, H. Walczak, J. Waugh, C.P. Huang, R.F. DuBose, R.G. Goodwin, and C.A. Smith. 1997. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J. Exp. Med.* 186:1165-1170.
39. Degli-Esposti, M.A., W.C. Dougall, P.J. Smolak, J.Y. Waugh, C.A. Smith, and R.G. Goodwin. 1997. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity.* 7:813-820.

40. Pitti, R.M., S.A. Marsters, D.A. Lawrence, M. Roy, F.C. Kischkel, P. Dowd, A. Huang, C.J. Donahue, S.W. Sherwood, D.T. Baldwin, P.J. Godowski, W.I. Wood, A.L. Gurney, K.J. Hillan, R.L. Cohen, A.D. Goddard, D. Botstein, and A. Ashkenazi. 1998. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396:699-703.
41. Migone, T.S., J. Zhang, X. Luo, L. Zhuang, C. Chen, B. Hu, J.S. Hong, J.W. Perry, S.F. Chen, J.X. Zhou, Y.H. Cho, S. Ullrich, P. Kanakaraj, J. Carrell, E. Boyd, H.S. Olsen, G. Hu, L. Pukac, D. Liu, J. Ni, S. Kim, R. Gentz, P. Feng, P.A. Moore, S.M. Ruben, and P. Wei. 2002. TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immunity*. 16:479-492.
42. Tartaglia, L.A., T.M. Ayres, G.H. Wong, and D.V. Goeddel. 1993. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74:845-853.
43. Itoh, N. and S. Nagata. 1993. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 268:10932-10937.
44. Chinnaiyan, A.M., K.O'Rourke, G.L. Yu, R.H. Lyons, M. Garg, D.R. Duan, L. Xing, R. Gentz, J. Ni, and V.M. Dixit. 1996. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274:990-992.
45. Pan, G., K.O'Rourke, A.M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni, and V.M. Dixit. 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276:111-113.
46. MacFarlane, M., M. Ahmad, S.M. Srinivasula, T. Fernandes-Alnemri, G.M. Cohen, and E.S. Alnemri. 1997. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 272:25417-25420.
47. Pan, G., J.H. Bauer, V. Haridas, S. Wang, D. Liu, G. Yu, C. Vincenz, B.B. Aggarwal, J. Ni, and V.M. Dixit. 1998. Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett.* 431:351-356.
48. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308.
49. Boldin, M.P., E.E. Varfolomeev, Z. Pancer, I.L. Mett, J.H. Camonis, and D. Wallach. 1995. 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.

50. Chinnaiyan,A.M., K.O'Rourke, M.Tewari, and V.M.Dixit. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81:505-512.
51. Kischkel,F.C., S.Hellbardt, I.Behrmann, M.Germer, M.Pawlita, P.H.Krammer, and M.E.Peter. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14:5579-5588.
52. Chinnaiyan,A.M., C.G.Tepper, M.F.Seldin, K.O'Rourke, F.C.Kischkel, S.Hellbardt, P.H.Krammer, M.E.Peter, and V.M.Dixit. 1996. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* 271:4961-4965.
53. Hsu,H., H.B.Shu, M.G.Pan, and D.V.Goeddel. 1996. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84:299-308.
54. Hsu,H., J.Xiong, and D.V.Goeddel. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81:495-504.
55. Enari,M., H.Hug, and S.Nagata. 1995. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 375:78-81.
56. Tewari,M. and V.M.Dixit. 1995. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J.Biol.Chem.* 270:3255-3260.
57. Muzio,M., A.M.Chinnaiyan, F.C.Kischkel, K.O'Rourke, A.Shevchenko, J.Ni, C.Scaffidi, J.D.Bretz, M.Zhang, R.Gentz, M.Mann, P.H.Krammer, M.E.Peter, and V.M.Dixit. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85:817-827.
58. Boldin,M.P., T.M.Goncharov, Y.V.Goltsev, and D.Wallach. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85:803-815.

59. Alnemri, E.S., D.J. Livingston, D.W. Nicholson, G. Salvesen, N.A. Thornberry, W.W. Wong, and J. Yuan. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87:171.
60. Wang, J., H.J. Chun, W. Wong, D.M. Spencer, and M.J. Lenardo. 2001. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98:13884-13888.
61. Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J. Tomaselli, K.M. Debatin, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17:1675-1687.
62. Peter, M.E., F.C. Kischkel, C.G. Scheuierpflug, J.P. Medema, K.M. Debatin, and P.H. Krammer. 1997. Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex. *Eur. J. Immunol.* 27:1207-1212.
63. Hakem, R., A. Hakem, G.S. Duncan, J.T. Henderson, M. Woo, M.S. Soengas, A. Elia, J.L. de la Pompa, D. Kagi, W. Khoo, J. Potter, R. Yoshida, S.A. Kaufman, S.W. Lowe, J.M. Penninger, and T.W. Mak. 1998. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94:339-352.
64. Yoshida, H., Y.Y. Kong, R. Yoshida, A.J. Elia, A. Hakem, R. Hakem, J.M. Penninger, and T.W. Mak. 1998. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 94:739-750.
65. Wei, M.C., W.X. Zong, E.H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A.J. Ross, K.A. Roth, G.R. MacGregor, C.B. Thompson, and S.J. Korsmeyer. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292:727-730.
66. Strasser, A., A.W. Harris, D.C. Huang, P.H. Krammer, and S. Cory. 1995. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J.* 14:6136-6147.
67. Krueger, A., S.C. Fas, S. Baumann, and P.H. Krammer. 2003. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol. Rev.* 193:58-69.

68. Yang, X., R. Khosravi-Far, H. Y. Chang, and D. Baltimore. 1997. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89:1067-1076.
69. Hsu, H., J. Huang, H. B. Shu, V. Baichwal, and D. V. Goeddel. 1996. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*. 4:387-396.
70. Duan, H. and V. M. Dixit. 1997. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* 385:86-89.
71. Hackett, R. J., L. S. Davis, and P. E. Lipsky. 1988. Comparative effects of tumor necrosis factor-alpha and IL-1 beta on mitogen-induced T cell activation. *J. Immunol.* 140:2639-2644.
72. Jelinek, D. F. and P. E. Lipsky. 1987. Enhancement of human B cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. *J. Immunol.* 139:2970-2976.
73. Ting, A. T., F. X. Pimentel-Muinos, and B. Seed. 1996. RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J.* 15:6189-6196.
74. Alderson, M. R., T. W. Tough, T. Davis-Smith, S. Braddy, B. Falk, K. A. Schooley, R. G. Goodwin, C. A. Smith, F. Ramsdell, and D. H. Lynch. 1995. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181:71-77.
75. Kataoka, T., R. C. Budd, N. Holler, M. Thome, F. Martinon, M. Irmler, K. Burns, M. Hahne, N. Kennedy, M. Kovacsovics, and J. Tschopp. 2000. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr. Biol.* 10:640-648.
76. Rasper, D. M., J. P. Vaillancourt, S. Hadano, V. M. Houtzager, I. Seiden, S. L. Keen, P. Tawa, S. Xanthoudakis, J. Nasir, D. Martindale, B. F. Koop, E. P. Peterson, N. A. Thornberry, J. Huang, D. P. MacPherson, S. C. Black, F. Hornung, M. J. Lenardo, M. R. Hayden, S. Roy, and D. W. Nicholson. 1998. 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.

77. Sato,T., S.Irie, S.Kitada, and J.C.Reed. 1995. FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 268:411-415.
78. Adam-Klages,S., D.Adam, K.Wiegmann, S.Struve, W.Kolanus, J.Schneider-Mergener, and M.Kronke. 1996. FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* 86:937-947.
79. Song,H.Y., J.D.Dunbar, Y.X.Zhang, D.Guo, and D.B.Donner. 1995. Identification of a protein with homology to hsp90 that binds the type 1 tumor necrosis factor receptor. *J.Biol.Chem.* 270:3574-3581.
80. Boldin,M.P., I.L.Mett, and D.Wallach. 1995. A protein related to a proteasomal subunit binds to the intracellular domain of the p55 TNF receptor upstream to its 'death domain'. *FEBS Lett.* 367:39-44.
81. Tsurumi,C., Y.Shimizu, M.Saeki, S.Kato, G.N.Demartino, C.A.Slaughter, M.Fujimuro, H.Yokosawa, M.Yamasaki, K.B.Hendil, Toh-e A, N.Tanahashi, and K.Tanaka. 1996. cDNA cloning and functional analysis of the p97 subunit of the 26S proteasome, a polypeptide identical to the type-1 tumor-necrosis-factor-receptor-associated protein-2/55.11. *Eur.J.Biochem.* 239:912-921.
82. Jiang,Y., J.D.Woronicz, W.Liu, and D.V.Goeddel. 1999. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283:543-546.
83. Hengartner,M.O. and H.R.Horvitz. 1994. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 4:581-586.
84. Cerretti,D.P., C.J.Kozlosky, B.Mosley, N.Nelson, K.Van Ness, T.A.Greenstreet, C.J.March, S.R.Kronheim, T.Druck, L.A.Cannizzaro, and . 1992. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256:97-100.
85. Thornberry,N.A., H.G.Bull, J.R.Calaycay, K.T.Chapman, A.D.Howard, M.J.Kostura, D.K.Miller, S.M.Molineaux, J.R.Weidner, J.Aunins, and . 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356:768-774.
86. Yuan,J., S.Shaham, S.Ledoux, H.M.Ellis, and H.R.Horvitz. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75:641-652.

87. Vaux,D.L., I.L.Weissman, and S.K.Kim. 1992. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258:1955-1957.
88. Hengartner,M.O. and H.R.Horvitz. 1994. *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* 76:665-676.
89. Zou,H., W.J.Henzel, X.Liu, A.Lutschg, and X.Wang. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90:405-413.
90. Thornberry,N.A. and Y.Lazebnik. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316.
91. Wang,S., M.Miura, Y.Jung, H.Zhu, V.Gagliardini, L.Shi, A.H.Greenberg, and J.Yuan. 1996. 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.
92. Van de,C.M., P.Vandenabeele, W.Declercq, d.B.Van, I, G.Van Loo, F.Molemans, P.Schotte, W.van Criekinge, R.Beyaert, and W.Fiers. 1997. Characterization of seven murine caspase family members. *FEBS Lett.* 403:61-69.
93. Humke,E.W., J.Ni, and V.M.Dixit. 1998. ERICE, a novel FLICE-activatable caspase. *J.Biol.Chem.* 273:15702-15707.
94. Van de,C.M., G.Van Loo, S.Pype, W.van Criekinge, d.B.Van, I, F.Molemans, W.Fiers, W.Declercq, and P.Vandenabeele. 1998. Identification of a new caspase homologue: caspase-14. *Cell Death.Differ.* 5:838-846.
95. Hofmann,K., P.Bucher, and J.Tschopp. 1997. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem.Sci.* 22:155-156.
96. Kumar,S. 1995. ICE-like proteases in apoptosis. *Trends Biochem.Sci.* 20:198-202.
97. Nicholson,D.W. and N.A.Thornberry. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem.Sci.* 22:299-306.

98. Kumar,S. 1999. Regulation of caspase activation in apoptosis: implications in pathogenesis and treatment of disease. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 26:295-303.
99. Walker,N.P., R.V.Talanian, K.D.Brady, L.C.Dang, N.J.Bump, C.R.Ferenz, S.Franklin, T.Ghayur, M.C.Hackett, L.D.Hammill, and . 1994. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 78:343-352.
100. Wilson,K.P., J.A.Black, J.A.Thomson, E.E.Kim, J.P.Griffith, M.A.Navia, M.A.Murcko, S.P.Chambers, R.A.Aldape, S.A.Raybuck, and . 1994. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370:270-275.
101. Rotonda,J., D.W.Nicholson, K.M.Fazil, M.Gallant, Y.Gareau, M.Labelle, E.P.Peterson, D.M.Rasper, R.Ruel, J.P.Vaillancourt, N.A.Thornberry, and J.W.Becker. 1996. The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat.Struct.Biol.* 3:619-625.
102. Li,P., D.Nijhawan, I.Budihardjo, S.M.Srinivasula, M.Ahmad, E.S.Alnemri, and X.Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
103. Darmon,A.J., D.W.Nicholson, and R.C.Bleackley. 1995. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377:446-448.
104. Martin,S.J., G.P.Amarante-Mendes, L.Shi, T.H.Chuang, C.A.Casiano, G.A.O'Brien, P.Fitzgerald, E.M.Tan, G.M.Bokoch, A.H.Greenberg, and D.R.Green. 1996. The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. *EMBO J.* 15:2407-2416.
105. Andrade,F., S.Roy, D.Nicholson, N.Thornberry, A.Rosen, and L.Casciola-Rosen. 1998. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity.* 8:451-460.

106. Zhou,Q. and G.S.Salvesen. 1997. Activation of pro-caspase-7 by serine proteases includes a non-canonical specificity. *Biochem.J.* 324 (Pt 2):361-364.
107. Schotte,P., W.van Criekege, C.M.Van de, G.Van Loo, M.Desmedt, J.Grooten, M.Cornelissen, L.De Ridder, J.Vandekerckhove, W.Fiers, P.Vandenabeele, and R.Beyaert. 1998. Cathepsin B-mediated activation of the proinflammatory caspase-11. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 251:379-387.
108. Vancompernelle,K., F.Van Herreweghe, G.Pynaert, C.M.Van de, K.De Vos, N.Totty, A.Sterling, W.Fiers, P.Vandenabeele, and J.Grooten. 1998. Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett.* 438:150-158.
109. Rano,T.A., T.Timkey, E.P.Peterson, J.Rotonda, D.W.Nicholson, J.W.Becker, K.T.Chapman, and N.A.Thornberry. 1997. A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE). *Chem.Biol.* 4:149-155.
110. Kayalar,C., T.Ord, M.P.Testa, L.T.Zhong, and D.E.Bredesen. 1996. Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:2234-2238.
111. Kothakota,S., T.Azuma, C.Reinhard, A.Klippel, J.Tang, K.Chu, T.J.McGarry, M.W.Kirschner, K.Koths, D.J.Kwiatkowski, and L.T.Williams. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278:294-298.
112. Kaufmann,S.H., S.Desnoyers, Y.Ottaviano, N.E.Davidson, and G.G.Poirier. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53:3976-3985.
113. Rheaume,E., L.Y.Cohen, F.Uhlmann, C.Lazure, A.Alam, J.Hurwitz, R.P.Sekaly, and F.Denis. 1997. The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 in vitro and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis. *EMBO J.* 16:6346-6354.
114. Li,H., H.Zhu, C.J.Xu, and J.Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.

115. Liu,X., H.Zou, C.Slaughter, and X.Wang. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-184.
116. Roy,S., C.I.Bayly, Y.Gareau, V.M.Houtzager, S.Kargman, S.L.Keen, K.Rowland, I.M.Seiden, N.A.Thornberry, and D.W.Nicholson. 2001. Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic "safety catch" regulatory tripeptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:6132-6137.
117. Hu,S., C.Vincenz, M.Buller, and V.M.Dixit. 1997. 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.* 272:9621-9624.
118. Bertin,J., R.C.Armstrong, S.Ottillie, D.A.Martin, Y.Wang, S.Banks, G.H.Wang, T.G.Senkevich, E.S.Alnemri, B.Moss, M.J.Lenardo, K.J.Tomaselli, and J.I.Cohen. 1997. 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.
119. Thome,M., P.Schneider, K.Hofmann, H.Fickenscher, E.Meinl, F.Neipel, C.Mattmann, K.Burns, J.L.Bodmer, M.Schroter, C.Scaffidi, P.H.Krammer, M.E.Peter, and J.Tschopp. 1997. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386:517-521.
120. Searles,R.P., E.P.Bergquam, M.K.Axthelm, and S.W.Wong. 1999. Sequence and genomic analysis of a Rhesus macaque rhadinovirus with similarity to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8. *J.Virol.* 73:3040-3053.
121. Meinl,E., H.Fickenscher, M.Thome, J.Tschopp, and B.Fleckenstein. 1998. Anti-apoptotic strategies of lymphotropic viruses. *Immunol.Today* 19:474-479.
122. Goltsev,Y.V., A.V.Kovalenko, E.Arnold, E.E.Varfolomeev, V.M.Brodianskii, and D.Wallach. 1997. CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J.Biol.Chem.* 272:19641-19644.
123. Han,D.K., P.M.Chaudhary, M.E.Wright, C.Friedman, B.J.Trask, R.T.Riedel, D.G.Baskin, S.M.Schwartz, and L.Hood. 1997. 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.

124. Inohara, N., T. Koseki, Y. Hu, S. Chen, and G. Nunez. 1997. CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94:10717-10722.
125. Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French, and J. Tschopp. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-195.
126. Shu, H. B., D. R. Halpin, and D. V. Goeddel. 1997. Casper is a. *Immunity*. 6:751-763.
127. Srinivasula, S. M., M. Ahmad, S. Otilie, F. Bullrich, S. Banks, Y. Wang, T. Fernandes-Alnemri, C. M. Croce, G. Litwack, K. J. Tomaselli, R. C. Armstrong, and E. S. Alnemri. 1997. FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272:18542-18545.
128. Scaffidi, C., I. Schmitz, P. H. Krammer, and M. E. Peter. 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274:1541-1548.
129. Yeh, W. C., A. Itie, A. J. Elia, M. Ng, H. B. Shu, A. Wakeham, C. Mirtsos, N. Suzuki, M. Bonnard, D. V. Goeddel, and T. W. Mak. 2000. Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*. 12:633-642.
130. Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P. H. Krammer, and S. Kirchhoff. 2001. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* 276:20633-20640.
131. Kirchhoff, S., W. W. Muller, A. Krueger, I. Schmitz, and P. H. Krammer. 2000. TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J. Immunol.* 165:6293-6300.
132. Kirchhoff, S., W. W. Muller, M. Li-Weber, and P. H. Krammer. 2000. Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur. J. Immunol.* 30:2765-2774.

133. Tschopp, J., M. Irmeler, and M. Thome. 1998. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr. Opin. Immunol.* 10:552-558.
134. Palumbo, G.J., D.J. Pickup, T.N. Fredrickson, L.J. McIntyre, and R.M. Buller. 1989. Inhibition of an inflammatory response is mediated by a 38-kDa protein of cowpox virus. *Virology* 172:262-273.
135. Ray, C.A., R.A. Black, S.R. Kronheim, T.A. Greenstreet, P.R. Sleath, G.S. Salvesen, and D.J. Pickup. 1992. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69:597-604.
136. Komiyama, T., C.A. Ray, D.J. Pickup, A.D. Howard, N.A. Thornberry, E.P. Peterson, and G. Salvesen. 1994. 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.
137. Los, M., C.M. Van de, L.C. Penning, H. Schenk, M. Westendorp, P.A. Baeuerle, W. Droge, P.H. Krammer, W. Fiers, and K. Schulze-Osthoff. 1995. Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature* 375:81-83.
138. Varfolomeev, E.E., M. Schuchmann, V. Luria, N. Chiannikulchai, J.S. Beckmann, I.L. Mett, D. Rebrikov, V.M. Brodianski, O.C. Kemper, O. Kollet, T. Lapidot, D. Soffer, T. Sobe, K.B. Avraham, T. Goncharov, H. Holtmann, P. Lonai, and D. Wallach. 1998. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity.* 9:267-276.
139. Zhou, Q., S. Snipas, K. Orth, M. Muzio, V.M. Dixit, and G.S. Salvesen. 1997. Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J. Biol. Chem.* 272:7797-7800.
140. Garcia-Calvo, M., E.P. Peterson, B. Leiting, R. Ruel, D.W. Nicholson, and N.A. Thornberry. 1998. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J. Biol. Chem.* 273:32608-32613.
141. Srinivasula, S.M., P. Datta, X.J. Fan, T. Fernandes-Alnemri, Z. Huang, and E.S. Alnemri. 2000. Molecular determinants of the caspase-promoting activity

- of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J.Biol.Chem.* 275:36152-36157.
142. Kuida,K., T.F.Haydar, C.Y.Kuan, Y.Gu, C.Taya, H.Karasuyama, M.S.Su, P.Rakic, and R.A.Flavell. 1998. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94:325-337.
 143. Smith,K.G., A.Strasser, and D.L.Vaux. 1996. CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease. *EMBO J.* 15:5167-5176.
 144. Clem,R.J., M.Fechheimer, and L.K.Miller. 1991. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 254:1388-1390.
 145. Ekert,P.G., J.Silke, and D.L.Vaux. 1999. Caspase inhibitors. *Cell Death.Differ.* 6:1081-1086.
 146. Xue,D. and H.R.Horvitz. 1995. Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* 377:248-251.
 147. Crook,N.E., R.J.Clem, and L.K.Miller. 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J.Virol.* 67:2168-2174.
 148. Birnbaum,M.J., R.J.Clem, and L.K.Miller. 1994. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J.Virol.* 68:2521-2528.
 149. Duckett,C.S., V.E.Nava, R.W.Gedrich, R.J.Clem, J.L.Van Dongen, M.C.Gilfillan, H.Shiels, J.M.Hardwick, and C.B.Thompson. 1996. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 15:2685-2694.
 150. Liston,P., N.Roy, K.Tamai, C.Lefebvre, S.Baird, G.Cherton-Horvat, R.Farahani, M.McLean, J.E.Ikeda, A.MacKenzie, and R.G.Korneluk. 1996. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379:349-353.

151. Roy, N., M.S. Mahadevan, M. McLean, G. Shutler, Z. Yaraghi, R. Farahani, S. Baird, A. Besner-Johnston, C. Lefebvre, X. Kang, and . 1995. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 80:167-178.
152. Rothe, M., M.G. Pan, W.J. Henzel, T.M. Ayres, and D.V. Goeddel. 1995. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83:1243-1252.
153. Salvesen, G.S. and C.S. Duckett. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:401-410.
154. Chu, Z.L., T.A. McKinsey, L. Liu, J.J. Gentry, M.H. Malim, and D.W. Ballard. 1997. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94:10057-10062.
155. Wang, C.Y., M.W. Mayo, R.G. Korneluk, D.V. Goeddel, and A.S. Baldwin, Jr. 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281:1680-1683.
156. Miller, L.K. 1999. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol.* 9:323-328.
157. Hinds, M.G., R.S. Norton, D.L. Vaux, and C.L. Day. 1999. Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat. Struct. Biol.* 6:648-651.
158. Sun, C., M. Cai, A.H. Gunasekera, R.P. Meadows, H. Wang, J. Chen, H. Zhang, W. Wu, N. Xu, S.C. Ng, and S.W. Fesik. 1999. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature* 401:818-822.
159. Duckett, C.S., F. Li, Y. Wang, K.J. Tomaselli, C.B. Thompson, and R.C. Armstrong. 1998. Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c. *Mol. Cell Biol.* 18:608-615.
160. Deveraux, Q.L. and J.C. Reed. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13:239-252.

161. Roy, N., Q.L. Deveraux, R. Takahashi, G.S. Salvesen, and J.C. Reed. 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 16:6914-6925.
162. Srinivasula, S.M., R. Hegde, A. Saleh, P. Datta, E. Shiozaki, J. Chai, R.A. Lee, P.D. Robbins, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi, and E.S. Alnemri. 2001. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410:112-116.
163. Sun, C., M. Cai, R.P. Meadows, N. Xu, A.H. Gunasekera, J. Herrmann, J.C. Wu, and S.W. Fesik. 2000. NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J. Biol. Chem.* 275:33777-33781.
164. Huang, Y., Y.C. Park, R.L. Rich, D. Segal, D.G. Myszka, and H. Wu. 2001. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 104:781-790.
165. Riedl, S.J., M. Renatus, R. Schwarzenbacher, Q. Zhou, C. Sun, S.W. Fesik, R.C. Liddington, and G.S. Salvesen. 2001. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104:791-800.
166. Chai, J., E. Shiozaki, S.M. Srinivasula, Q. Wu, P. Datta, E.S. Alnemri, Y. Shi, and P. Datta. 2001. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 104:769-780.
167. Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, and R. Takahashi. 2001. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98:8662-8667.
168. Holcik, M., C.S. Thompson, Z. Yaraghi, C.A. Lefebvre, A.E. MacKenzie, and R.G. Korneluk. 2000. The hippocampal neurons of neuronal apoptosis inhibitory protein 1 (NAIP1)-deleted mice display increased vulnerability to kainic acid-induced injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97:2286-2290.
169. Harlin, H., S.B. Reffey, C.S. Duckett, T. Lindsten, and C.B. Thompson. 2001. Characterization of XIAP-deficient mice. *Mol. Cell Biol.* 21:3604-3608.
170. Khoshnan, A., C. Tindell, I. Laux, D. Bae, B. Bennett, and A.E. Nel. 2000. The NF-kappa B cascade is important in Bcl-xL expression and for the anti-apoptotic

effects of the CD28 receptor in primary human CD4⁺ lymphocytes.
J.Immunol. 165:1743-1754.

171. Kaji,T., S.Hachimura, W.Ise, and S.Kaminogawa. 2003. Proteome analysis reveals caspase activation in hyporesponsive CD4 T lymphocytes induced in vivo by the oral administration of antigen. *J.Biol.Chem.* 278:27836-27843.
172. Kornacker,M., M.R.Verneris, B.Kornacker, C.Scheffold, and R.S.Negrin. 2001. Survivin expression correlates with apoptosis resistance after lymphocyte activation and is found preferentially in memory T cells. *Immunol.Lett.* 76:169-173.
173. Du,C., M.Fang, Y.Li, L.Li, and X.Wang. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.
174. Verhagen,A.M., P.G.Ekert, M.Pakusch, J.Silke, L.M.Connolly, G.E.Reid, R.L.Moritz, R.J.Simpson, and D.L.Vaux. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102:43-53.
175. Deng,Y., Y.Lin, and X.Wu. 2002. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev.* 16:33-45.
176. Sun,X.M., S.B.Bratton, M.Butterworth, M.MacFarlane, and G.M.Cohen. 2002. Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *J.Biol.Chem.* 277:11345-11351.
177. Roberts,D.L., W.Merrison, M.MacFarlane, and G.M.Cohen. 2001. The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. *J.Cell Biol.* 153:221-228.
178. Okada,H., W.K.Suh, J.Jin, M.Woo, C.Du, A.Elia, G.S.Duncan, A.Wakeham, A.Itie, S.W.Lowe, X.Wang, and T.W.Mak. 2002. Generation and characterization of Smac/DIABLO-deficient mice. *Mol.Cell Biol.* 22:3509-3517.
179. Suzuki,Y., Y.Imai, H.Nakayama, K.Takahashi, K.Takio, and R.Takahashi. 2001. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol.Cell* 8:613-621.

180. Martins, L.M., I. Iaccarino, T. Tenev, S. Gschmeissner, N.F. Totty, N.R. Lemoine, J. Savopoulos, C.W. Gray, C.L. Creasy, C. Dingwall, and J. Downward. 2002. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J. Biol. Chem.* 277:439-444.
181. Bakhshi, A., J.P. Jensen, P. Goldman, J.J. Wright, O.W. McBride, A.L. Epstein, and S.J. Korsmeyer. 1985. 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.
182. Cleary, M.L. and J. Sklar. 1985. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 82:7439-7443.
183. Tsujimoto, Y., J. Gorham, J. Cossman, E. Jaffe, and C.M. Croce. 1985. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 229:1390-1393.
184. Strasser, A., L. O'Connor, and V.M. Dixit. 2000. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 69:217-245.
185. Cory, S. and J.M. Adams. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2:647-656.
186. Reed, J.C. 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17:3225-3236.
187. Muchmore, S.W., M. Sattler, H. Liang, R.P. Meadows, J.E. Harlan, H.S. Yoon, D. Nettlesheim, B.S. Chang, C.B. Thompson, S.L. Wong, S.L. Ng, and S.W. Fesik. 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381:335-341.
188. Oltvai, Z.N., C.L. Millman, and S.J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-619.
189. Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.

190. Schmitz,I., A.Krueger, S.Baumann, H.Schulze-Bergkamen, P.H.Krammer, and S.Kirchhoff. 2003. An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *J.Immunol.* 171:2930-2936.
191. Henkart,P.A. 1985. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu.Rev.Immunol.* 3:31-58.
192. Kagi,D., B.Ledermann, K.Burki, P.Seiler, B.Odermatt, K.J.Olsen, E.R.Podack, R.M.Zinkernagel, and H.Hengartner. 1994. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369:31-37.
193. Lowin,B., F.Beermann, A.Schmidt, and J.Tschopp. 1994. A null mutation in the perforin gene impairs cytolytic T lymphocyte- and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:11571-11575.
194. Jenne,D.E. and J.Tschopp. 1988. Granzymes, a family of serine proteases released from granules of cytolytic T lymphocytes upon T cell receptor stimulation. *Immunol.Rev.* 103:53-71.
195. Bleackley,R.C., C.G.Lobe, B.Duggan, N.Ehrman, C.Fregeau, M.Meier, M.Letellier, C.Havele, J.Shaw, and V.Paetkau. 1988. The isolation and characterization of a family of serine protease genes expressed in activated cytotoxic T lymphocytes. *Immunol.Rev.* 103:5-19.
196. Muller-Eberhard,H.J. 1986. The membrane attack complex of complement. *Annu.Rev.Immunol.* 4:503-528.
197. Uellner,R., M.J.Zvelebil, J.Hopkins, J.Jones, L.K.MacDougall, B.P.Morgan, E.Podack, M.D.Waterfield, and G.M.Griffiths. 1997. Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. *EMBO J.* 16:7287-7296.
198. Walsh,C.M., M.Matloubian, C.C.Liu, R.Ueda, C.G.Kurahara, J.L.Christensen, M.T.Huang, J.D.Young, R.Ahmed, and W.R.Clark. 1994. Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:10854-10858.

199. Kagi,D., B.Ledermann, K.Burki, H.Hengartner, and R.M.Zinkernagel. 1994. CD8+ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity. *Eur.J.Immunol.* 24:3068-3072.
200. Pena,S.V., D.A.Hanson, B.A.Carr, T.J.Goralski, and A.M.Krensky. 1997. Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *J.Immunol.* 158:2680-2688.
201. Gamen,S., D.A.Hanson, A.Kaspar, J.Naval, A.M.Krensky, and A.Anel. 1998. Granulysin-induced apoptosis. I. Involvement of at least two distinct pathways. *J.Immunol.* 161:1758-1764.
202. Andrin,C., M.J.Pinkoski, K.Burns, E.A.Atkinson, O.Krahenbuhl, D.Hudig, S.A.Fraser, U.Winkler, J.Tschopp, M.Opas, R.C.Bleackley, and M.Michalak. 1998. Interaction between a Ca²⁺-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. *Biochemistry* 37:10386-10394.
203. MacDermott,R.P., R.E.Schmidt, J.P.Caulfield, A.Hein, G.T.Bartley, J.Ritz, S.F.Schlossman, K.F.Austen, and R.L.Stevens. 1985. Proteoglycans in cell-mediated cytotoxicity. Identification, localization, and exocytosis of a chondroitin sulfate proteoglycan from human cloned natural killer cells during target cell lysis. *J.Exp.Med.* 162:1771-1787.
204. Galvin,J.P., L.H.Spaeny-Dekking, B.Wang, P.Seth, C.E.Hack, and C.J.Froelich. 1999. Apoptosis induced by granzyme B-glycosaminoglycan complexes: implications for granule-mediated apoptosis in vivo. *J.Immunol.* 162:5345-5350.
205. de Saint,B.G. and A.Fischer. 2001. The role of cytotoxicity in lymphocyte homeostasis. *Curr.Opin.Immunol.* 13:549-554.
206. Haddad,E.K., X.Wu, J.A.Hammer, III, and P.A.Henkart. 2001. Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice. *J.Cell Biol.* 152:835-842.
207. Stinchcombe,J.C., D.C.Barral, E.H.Mules, S.Booth, A.N.Hume, L.M.Machesky, M.C.Seabra, and G.M.Griffiths. 2001. Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J.Cell Biol.* 152:825-834.

208. Bossi,G. and G.M.Griffiths. 1999. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat.Med.* 5:90-96.
209. Henkart,P.A., G.A.Berrebi, H.Takayama, W.E.Munger, and M.V.Sitkovsky. 1987. Biochemical and functional properties of serine esterases in acidic cytoplasmic granules of cytotoxic T lymphocytes. *J.Immunol.* 139:2398-2405.
210. Jenne,D.E., D.Masson, M.Zimmer, J.A.Haefliger, W.H.Li, and J.Tschopp. 1989. Isolation and complete structure of the lymphocyte serine protease granzyme G, a novel member of the granzyme multigene family in murine cytolytic T lymphocytes. Evolutionary origin of lymphocyte proteases. *Biochemistry* 28:7953-7961.
211. Kam,C.M., D.Hudig, and J.C.Powers. 2000. Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. *Biochim.Biophys.Acta* 1477:307-323.
212. Caputo,A., R.S.Garner, U.Winkler, D.Hudig, and R.C.Bleackley. 1993. Activation of recombinant murine cytotoxic cell proteinase-1 requires deletion of an amino-terminal dipeptide. *J.Biol.Chem.* 268:17672-17675.
213. McGuire,M.J., P.E.Lipsky, and D.L.Thiele. 1993. Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I. *J.Biol.Chem.* 268:2458-2467.
214. Pham,C.T., D.A.Thomas, J.D.Mercer, and T.J.Ley. 1998. Production of fully active recombinant murine granzyme B in yeast. *J.Biol.Chem.* 273:1629-1633.
215. Pham,C.T. and T.J.Ley. 1999. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:8627-8632.
216. Waugh,S.M., J.L.Harris, R.Fletcher, and C.S.Craik. 2000. The structure of the pro-apoptotic protease granzyme B reveals the molecular determinants of its specificity. *Nat.Struct.Biol.* 7:762-765.

217. Heusel, J.W., R.L. Wesselschmidt, S. Shresta, J.H. Russell, and T.J. Ley. 1994. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76:977-987.
218. Shi, L., S. Mai, S. Israels, K. Browne, J.A. Trapani, and A.H. Greenberg. 1997. Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *J. Exp. Med.* 185:855-866.
219. Odake, S., C.M. Kam, L. Narasimhan, M. Poe, J.T. Blake, O. Krahenbuhl, J. Tschopp, and J.C. Powers. 1991. Human and murine cytotoxic T lymphocyte serine proteases: subsite mapping with peptide thioester substrates and inhibition of enzyme activity and cytolysis by isocoumarins. *Biochemistry* 30:2217-2227.
220. Thornberry, N.A., T.A. Rano, E.P. Peterson, D.M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V.M. Houtzager, P.A. Nordstrom, S. Roy, J.P. Vaillancourt, K.T. Chapman, and D.W. Nicholson. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272:17907-17911.
221. Fernandes-Alnemri, T., R.C. Armstrong, J. Krebs, S.M. Srinivasula, L. Wang, F. Bullrich, L.C. Fritz, J.A. Trapani, K.J. Tomaselli, G. Litwack, and E.S. Alnemri. 1996. 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* 93:7464-7469.
222. Harvey, N.L., J.A. Trapani, T. Fernandes-Alnemri, G. Litwack, E.S. Alnemri, and S. Kumar. 1996. Processing of the Nedd2 precursor by ICE-like proteases and granzyme B. *Genes Cells* 1:673-685.
223. Darmon, A.J., T.J. Ley, D.W. Nicholson, and R.C. Bleackley. 1996. Cleavage of CPP32 by granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. *J. Biol. Chem.* 271:21709-21712.
224. Browne, K.A., R.W. Johnstone, D.A. Jans, and J.A. Trapani. 2000. Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275:39262-39266.

225. Thomas,D.A., C.Du, M.Xu, X.Wang, and T.J.Ley. 2000. DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity*. 12:621-632.
226. Sharif-Askari,E., A.Alam, E.Rheaume, P.J.Beresford, C.Scotto, K.Sharma, D.Lee, W.E.DeWolf, M.E.Nuttall, J.Lieberman, and R.P.Sekaly. 2001. Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *EMBO J*. 20:3101-3113.
227. Barry,M., J.A.Heibein, M.J.Pinkoski, S.F.Lee, R.W.Moyer, D.R.Green, and R.C.Bleackley. 2000. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol.Cell Biol*. 20:3781-3794.
228. Sutton,V.R., J.E.Davis, M.Cancilla, R.W.Johnstone, A.A.Ruefli, K.Sedelies, K.A.Browne, and J.A.Trapani. 2000. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J.Exp.Med*. 192:1403-1414.
229. Pinkoski,M.J., N.J.Waterhouse, J.A.Heibein, B.B.Wolf, T.Kuwana, J.C.Goldstein, D.D.Newmeyer, R.C.Bleackley, and D.R.Green. 2001. Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *J.Biol.Chem*. 276:12060-12067.
230. Goping,I.S., M.Barry, P.Liston, T.Sawchuk, G.Constantinescu, K.M.Michalak, I.Shostak, D.L.Roberts, A.M.Hunter, R.Korneluk, and R.C.Bleackley. 2003. Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity*. 18:355-365.
231. Thomas,D.A., L.Scorrano, G.V.Putchu, S.J.Korsmeyer, and T.J.Ley. 2001. Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:14985-14990.
232. Pasternack,M.S., C.R.Verret, M.A.Liu, and H.N.Eisen. 1986. Serine esterase in cytolytic T lymphocytes. *Nature* 322:740-743.
233. Pasternack,M.S., K.J.Bleier, and T.N.McInerney. 1991. Granzyme A binding to target cell proteins. Granzyme A binds to and cleaves nucleolin in vitro. *J.Biol.Chem*. 266:14703-14708.

234. Suidan, H.S., J. Bouvier, E. Schaerer, S.R. Stone, D. Monard, and J. Tschopp. 1994. Granzyme A released upon stimulation of cytotoxic T lymphocytes activates the thrombin receptor on neuronal cells and astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91:8112-8116.
235. Irmiler, M., S. Hertig, H.R. MacDonald, R. Sadoul, J.D. Becherer, A. Proudfoot, R. Solari, and J. Tschopp. 1995. Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *J. Exp. Med.* 181:1917-1922.
236. Beresford, P.J., C.M. Kam, J.C. Powers, and J. Lieberman. 1997. Recombinant human granzyme A binds to two putative HLA-associated proteins and cleaves one of them. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94:9285-9290.
237. Froelich, C.J., X. Zhang, J. Turbov, D. Hudig, U. Winkler, and W.L. Hanna. 1993. Human granzyme B degrades aggrecan proteoglycan in matrix synthesized by chondrocytes. *J. Immunol.* 151:7161-7171.
238. Anel, A., S. Gamen, M.A. Alava, A.M. Schmitt-Verhulst, A. Pineiro, and J. Naval. 1997. Inhibition of CPP32-like proteases prevents granzyme B- and Fas-, but not granzyme A-based cytotoxicity exerted by CTL clones. *J. Immunol.* 158:1999-2006.
239. Beresford, P.J., Z. Xia, A.H. Greenberg, and J. Lieberman. 1999. Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity.* 10:585-594.
240. Shi, L., C.M. Kam, J.C. Powers, R. Aebersold, and A.H. Greenberg. 1992. Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J. Exp. Med.* 176:1521-1529.
241. Shiver, J.W., L. Su, and P.A. Henkart. 1992. Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukemia cells expressing both cytolysin and granzyme A. *Cell* 71:315-322.
242. Edwards, K.M., C.M. Kam, J.C. Powers, and J.A. Trapani. 1999. The human cytotoxic T cell granule serine protease granzyme H has chymotrypsin-like (chymase) activity and is taken up into cytoplasmic vesicles reminiscent of granzyme B-containing endosomes. *J. Biol. Chem.* 274:30468-30473.

243. Sun,J., C.H.Bird, V.Sutton, L.McDonald, P.B.Coughlin, T.A.De Jong, J.A.Trapani, and P.I.Bird. 1996. A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 271:27802-27809.
244. Sun,J., L.Ooms, C.H.Bird, V.R.Sutton, J.A.Trapani, and P.I.Bird. 1997. A new family of 10 murine ovalbumin serpins includes two homologs of proteinase inhibitor 8 and two homologs of the granzyme B inhibitor (proteinase inhibitor 9). *J.Biol.Chem.* 272:15434-15441.
245. Bird,C.H., V.R.Sutton, J.Sun, C.E.Hirst, A.Novak, S.Kumar, J.A.Trapani, and P.I.Bird. 1998. Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Mol.Cell Biol.* 18:6387-6398.
246. Bird,C.H., E.J.Blink, C.E.Hirst, M.S.Buzza, P.M.Steele, J.Sun, D.A.Jans, and P.I.Bird. 2001. Nucleocytoplasmic distribution of the ovalbumin serpin PI-9 requires a nonconventional nuclear import pathway and the export factor Crm1. *Mol.Cell Biol.* 21:5396-5407.
247. Andrade,F., H.G.Bull, N.A.Thornberry, G.W.Ketner, L.A.Casciola-Rosen, and A.Rosen. 2001. Adenovirus L4-100K assembly protein is a granzyme B substrate that potently inhibits granzyme B-mediated cell death. *Immunity.* 14:751-761.
248. Spaeny-Dekking,E.H., A.M.Kamp, C.J.Froelich, and C.E.Hack. 2000. Extracellular granzyme A, complexed to proteoglycans, is protected against inactivation by protease inhibitors. *Blood* 95:1465-1472.
249. Trapani,J.A. and M.J.Smyth. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat.Rev.Immunol.* 2:735-747.
250. Motyka,B., G.Korbitt, M.J.Pinkoski, J.A.Heibein, A.Caputo, M.Hobman, M.Barry, I.Shostak, T.Sawchuk, C.F.Holmes, J.Gauldie, and R.C.Bleackley. 2000. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103:491-500.
251. Metkar,S.S., B.Wang, M.Aguilar-Santelises, S.M.Raja, L.Uhlin-Hansen, E.Podack, J.A.Trapani, and C.J.Froelich. 2002. Cytotoxic cell granule-mediated

- apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity*. 16:417-428.
252. Benedict,C.A., T.A.Banks, L.Senderowicz, M.Ko, W.J.Britt, A.Angulo, P.Ghazal, and C.F.Ware. 2001. Lymphotoxins and cytomegalovirus cooperatively induce interferon-beta, establishing host-virus detente. *Immunity*. 15:617-626.
253. Benedict,C.A., P.S.Norris, and C.F.Ware. 2002. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nat.Immunol.* 3:1013-1018.
254. Kagi,D., P.Seiler, J.Pavlovic, B.Ledermann, K.Burki, R.M.Zinkernagel, and H.Hengartner. 1995. The roles of perforin- and Fas-dependent cytotoxicity in protection against cytopathic and noncytopathic viruses. *Eur.J.Immunol.* 25:3256-3262.
255. Mullbacher,A., R.T.Hla, C.Museteanu, and M.M.Simon. 1999. Perforin is essential for control of ectromelia virus but not related poxviruses in mice. *J.Virol.* 73:1665-1667.
256. Rossi,C.P., A.McAllister, M.Tanguy, D.Kagi, and M.Brahic. 1998. Theiler's virus infection of perforin-deficient mice. *J.Virol.* 72:4515-4519.
257. Tang,Y., A.W.Hugin, N.A.Giese, L.Gabriele, S.K.Chattopadhyay, T.N.Fredrickson, D.Kagi, J.W.Hartley, and H.C.Morse, III. 1997. Control of immunodeficiency and lymphoproliferation in mouse AIDS: studies of mice deficient in CD8+ T cells or perforin. *J.Virol.* 71:1808-1813.
258. Riera,L., M.Gariglio, G.Valente, A.Mullbacher, C.Museteanu, S.Landolfo, and M.M.Simon. 2000. Murine cytomegalovirus replication in salivary glands is controlled by both perforin and granzymes during acute infection. *Eur.J.Immunol.* 30:1350-1355.
259. Mullbacher,A., P.Waring, H.R.Thal, T.Tran, S.Chin, T.Stehle, C.Museteanu, and M.M.Simon. 1999. Granzymes are the essential downstream effector molecules for the control of primary virus infections by cytolytic leukocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:13950-13955.
260. Lin,M.T., S.A.Stohlman, and D.R.Hinton. 1997. Mouse hepatitis virus is cleared from the central nervous systems of mice lacking perforin-mediated cytotoxicity. *J.Virol.* 71:383-391.

261. Parra,B., M.T.Lin, S.A.Stohlman, C.C.Bergmann, R.Atkinson, and D.R.Hinton. 2000. Contributions of Fas-Fas ligand interactions to the pathogenesis of mouse hepatitis virus in the central nervous system. *J.Virol.* 74:2447-2450.
262. Fleck,M., E.R.Kern, T.Zhou, J.Podlech, W.Wintersberger, C.K.Edwards, III, and J.D.Mountz. 1998. Apoptosis mediated by Fas but not tumor necrosis factor receptor 1 prevents chronic disease in mice infected with murine cytomegalovirus. *J.Clin.Invest* 102:1431-1443.
263. Nagata,S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355-365.
264. Kayagaki,N., N.Yamaguchi, M.Nakayama, K.Takeda, H.Akiba, H.Tsutsui, H.Okamura, K.Nakanishi, K.Okumura, and H.Yagita. 1999. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J.Immunol.* 163:1906-1913.
265. Kayagaki,N., N.Yamaguchi, M.Nakayama, A.Kawasaki, H.Akiba, K.Okumura, and H.Yagita. 1999. Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J.Immunol.* 162:2639-2647.
266. Mariani,S.M. and P.H.Krammer. 1998. Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur.J.Immunol.* 28:1492-1498.
267. Jeremias,I., I.Herr, T.Boehler, and K.M.Debatin. 1998. TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells. *Eur.J.Immunol.* 28:143-152.
268. Thomas,W.D. and P.Hersey. 1998. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J.Immunol.* 161:2195-2200.
269. Smith,K.J. and H.G.Skelton. 2001. Rapid onset of cutaneous squamous cell carcinoma in patients with rheumatoid arthritis after starting tumor necrosis factor alpha receptor IgG1-Fc fusion complex therapy. *J.Am.Acad.Dermatol.* 45:953-956.
270. Shustov,A., I.Luzina, P.Nguyen, J.C.Papadimitriou, B.Handwerker, K.B.Elkon, and C.S.Via. 2000. Role of perforin in controlling B-cell hyperactivity and humoral autoimmunity. *J.Clin.Invest* 106:R39-R47.

271. Trapani, J.A., J. Davis, V.R. Sutton, and M.J. Smyth. 2000. Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Curr. Opin. Immunol.* 12:323-329.
272. Smyth, M.J., K.Y. Thia, E. Cretney, J.M. Kelly, M.B. Snook, C.A. Forbes, and A.A. Scalzo. 1999. Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J. Immunol.* 162:6658-6662.
273. Kodama, T., K. Takeda, O. Shimozato, Y. Hayakawa, M. Atsuta, K. Kobayashi, M. Ito, H. Yagita, and K. Okumura. 1999. Perforin-dependent NK cell cytotoxicity is sufficient for anti-metastatic effect of IL-12. *Eur. J. Immunol.* 29:1390-1396.
274. Amakawa, R., A. Hakem, T.M. Kundig, T. Matsuyama, J.J. Simard, E. Timms, A. Wakeham, H.W. Mittrucker, H. Griesser, H. Takimoto, R. Schmits, A. Shahinian, P. Ohashi, J.M. Penninger, and T.W. Mak. 1996. Impaired negative selection of T cells in Hodgkin's disease antigen CD30-deficient mice. *Cell* 84:551-562.
275. Alam, A., M.Y. Braun, F. Hartgers, S. Lesage, L. Cohen, P. Hugo, F. Denis, and R.P. Sekaly. 1997. Specific activation of the cysteine protease CPP32 during the negative selection of T cells in the thymus. *J. Exp. Med.* 186:1503-1512.
276. Lenardo, M., K.M. Chan, F. Hornung, H. McFarland, R. Siegel, J. Wang, and L. Zheng. 1999. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu. Rev. Immunol.* 17:221-253.
277. Watanabe-Fukunaga, R., C.I. Brannan, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and S. Nagata. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356:314-317.
278. Cohen, P.L. and R.A. Eisenberg. 1991. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu. Rev. Immunol.* 9:243-269.
279. Zheng, L., G. Fisher, R.E. Miller, J. Peschon, D.H. Lynch, and M.J. Lenardo. 1995. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377:348-351.

280. Stepp,S.E., R.Dufourcq-Lagelouse, F.Le Deist, S.Bhawan, S.Certain, P.A.Mathew, J.I.Henter, M.Bennett, A.Fischer, B.G.de Saint, and V.Kumar. 1999. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* 286:1957-1959.
281. Kagi,D., B.Odermatt, and T.W.Mak. 1999. Homeostatic regulation of CD8+ T cells by perforin. *Eur.J.Immunol.* 29:3262-3272.
282. Badovinac,V.P., A.R.Tvinnereim, and J.T.Harty. 2000. Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science* 290:1354-1358.
283. Matloubian,M., M.Suresh, A.Glass, M.Galvan, K.Chow, J.K.Whitmire, C.M.Walsh, W.R.Clark, and R.Ahmed. 1999. A role for perforin in downregulating T-cell responses during chronic viral infection. *J.Virol.* 73:2527-2536.
284. Smith,C.A., T.Davis, D.Anderson, L.Solam, M.P.Beckmann, R.Jerzy, S.K.Dower, D.Cosman, and R.G.Goodwin. 1990. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248:1019-1023.
285. Reading,P.C., A.Khanna, and G.L.Smith. 2002. Vaccinia virus CrmE encodes a soluble and cell surface tumor necrosis factor receptor that contributes to virus virulence. *Virology* 292:285-298.
286. Upton,C., J.L.Macen, M.Schreiber, and G.McFadden. 1991. Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology* 184:370-382.
287. Shisler,J., C.Yang, B.Walter, C.F.Ware, and L.R.Gooding. 1997. The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis. *J.Virol.* 71:8299-8306.
288. Tollefson,A.E., T.W.Hermiston, D.L.Lichtenstein, C.F.Colle, R.A.Tripp, T.Dimitrov, K.Toth, C.E.Wells, P.C.Doherty, and W.S.Wold. 1998. Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature* 392:726-730.

289. Stewart,A.R., A.E.Tollefson, P.Krajcsi, S.P.Yei, and W.S.Wold. 1995. The adenovirus E3 10.4K and 14.5K proteins, which function to prevent cytolysis by tumor necrosis factor and to down-regulate the epidermal growth factor receptor, are localized in the plasma membrane. *J.Virol.* 69:172-181.
290. Piguet,V., O.Schwartz, S.Le Gall, and D.Trono. 1999. The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: a paradigm for the modulation of cell surface receptors. *Immunol.Rev.* 168:51-63.
291. Raftery,M.J., C.K.Behrens, A.Muller, P.H.Krammer, H.Walczak, and G.Schonrich. 1999. Herpes simplex virus type 1 infection of activated cytotoxic T cells: Induction of fratricide as a mechanism of viral immune evasion. *J.Exp.Med.* 190:1103-1114.
292. Raftery,M.J., M.Schwab, S.M.Eibert, Y.Samstag, H.Walczak, and G.Schonrich. 2001. Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity.* 15:997-1009.
293. Lama,J. and C.F.Ware. 2000. Human immunodeficiency virus type 1 Nef mediates sustained membrane expression of tumor necrosis factor and the related cytokine LIGHT on activated T cells. *J.Virol.* 74:9396-9402.
294. Sedger,L.M., D.M.Shows, R.A.Blanton, J.J.Peschon, R.G.Goodwin, D.Cosman, and S.R.Wiley. 1999. IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J.Immunol.* 163:920-926.
295. Vidalain,P.O., O.Azocar, B.Lamouille, A.Astier, C.Rabourdin-Combe, and C.Servet-Delprat. 2000. Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *J.Virol.* 74:556-559.
296. White,E., R.Cipriani, P.Sabbatini, and A.Denton. 1991. Adenovirus E1B 19-kilodalton protein overcomes the cytotoxicity of E1A proteins. *J.Virol.* 65:2968-2978.
297. Henderson,S., D.Huen, M.Rowe, C.Dawson, G.Johnson, and A.Rickinson. 1993. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:8479-8483.

298. Marshall, W.L., R.Datta, K.Hanify, E.Teng, and R.W.Finberg. 1999. U937 cells overexpressing bcl-xl are resistant to human immunodeficiency virus-1-induced apoptosis and human immunodeficiency virus-1 replication. *Virology* 256:1-7.
299. Goldmacher, V.S., L.M.Bartle, A.Skaletskaya, C.A.Dionne, N.L.Kedersha, C.A.Vater, J.W.Han, R.J.Lutz, S.Watanabe, E.D.Cahir McFarland, E.D.Kieff, E.S.Mocarski, and T.Chittenden. 1999. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:12536-12541.
300. Miura, M., R.M.Friedlander, and J.Yuan. 1995. Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:8318-8322.
301. Talley, A.K., S.Dewhurst, S.W.Perry, S.C.Dollard, S.Gummuluru, S.M.Fine, D.New, L.G.Epstein, H.E.Gendelman, and H.A.Gelbard. 1995. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in human neuronal cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and the genes bcl-2 and crmA. *Mol.Cell Biol.* 15:2359-2366.
302. Thome, M. and J.Tschopp. 2001. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat.Rev.Immunol.* 1:50-58.
303. Tsukahara, T., M.Kannagi, T.Ohashi, H.Kato, M.Arai, G.Nunez, Y.Iwanaga, N.Yamamoto, K.Ohtani, M.Nakamura, and M.Fujii. 1999. Induction of Bcl-x(L) expression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through NF-kappaB in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax. *J.Virol.* 73:7981-7987.
304. Sieg, S., L.Xia, Y.Huang, and D.Kaplan. 1995. Specific inhibition of granzyme B by parainfluenza virus type 3. *J.Virol.* 69:3538-3541.
305. Badley, A.D., D.Dockrell, and C.V.Paya. 1997. Apoptosis in AIDS. *Adv.Pharmacol.* 41:271-294.
306. Gougeon, M.L., A.G.Laurent-Crawford, A.G.Hovanessian, and L.Montagnier. 1993. Direct and indirect mechanisms mediating apoptosis during HIV infection: contribution to in vivo CD4 T cell depletion. *Semin.Immunol.* 5:187-194.

307. Badley,A.D., A.A.Pilon, A.Landay, and D.H.Lynch. 2000. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. *Blood* 96:2951-2964.
308. Nie,Z., B.N.Phenix, J.J.Lum, A.Alam, D.H.Lynch, B.Beckett, P.H.Krammer, R.P.Sekaly, and A.D.Badley. 2002. HIV-1 protease processes procaspase 8 to cause mitochondrial release of cytochrome c, caspase cleavage and nuclear fragmentation. *Cell Death.Differ.* 9:1172-1184.
309. Migueles,S.A., A.C.Laborico, W.L.Shupert, M.S.Sabbaghian, R.Rabin, C.W.Hallahan, D.Van Baarle, S.Kostense, F.Miedema, M.McLaughlin, L.Ehler, J.Metcalf, S.Liu, and M.Connors. 2002. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat.Immunol.* 3:1061-1068.
310. Cleary,M.L., S.D.Smith, and J.Sklar. 1986. 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.
311. Bullani,R.R., P.Wehrli, I.Viard-Leveugle, D.Rimoldi, J.C.Cerottini, J.H.Saurat, J.Tschopp, and L.E.French. 2002. Frequent downregulation of Fas (CD95) expression and function in melanoma. *Melanoma Res.* 12:263-270.
312. Maecker,H.L., Z.Yun, H.T.Maecker, and A.J.Giaccia. 2002. Epigenetic changes in tumor Fas levels determine immune escape and response to therapy. *Cancer Cell* 2:139-148.
313. Shin,M.S., H.S.Kim, S.H.Lee, W.S.Park, S.Y.Kim, J.Y.Park, J.H.Lee, S.K.Lee, S.N.Lee, S.S.Jung, J.Y.Han, H.Kim, J.Y.Lee, and N.J.Yoo. 2001. Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res.* 61:4942-4946.
314. Lee,S.H., M.S.Shin, H.S.Kim, H.K.Lee, W.S.Park, S.Y.Kim, J.H.Lee, S.Y.Han, J.Y.Park, R.R.Oh, C.S.Kang, K.M.Kim, J.J.Jang, S.W.Nam, J.Y.Lee, and N.J.Yoo. 2001. Somatic mutations of TRAIL-receptor 1 and TRAIL-receptor 2 genes in non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 20:399-403.
315. Fisher,M.J., A.K.Virmani, L.Wu, R.Aplenc, J.C.Harper, S.M.Powell, T.R.Rebbeck, D.Sidransky, A.F.Gazdar, and W.S.el Deiry. 2001. Nucleotide

- substitution in the ectodomain of trail receptor DR4 is associated with lung cancer and head and neck cancer. *Clin.Cancer Res.* 7:1688-1697.
316. Cretney,E., K.Takeda, H.Yagita, M.Glaccum, J.J.Peschon, and M.J.Smyth. 2002. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J.Immunol.* 168:1356-1361.
317. Bai,C., B.Connolly, M.L.Metzker, C.A.Hilliard, X.Liu, V.Sandig, A.Soderman, S.M.Galloway, Q.Liu, C.P.Austin, and C.T.Caskey. 2000. Overexpression of M68/DcR3 in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:1230-1235.
318. Bennett,M.W., J.O'Connell, G.C.O'Sullivan, C.Brady, D.Roche, J.K.Collins, and F.Shanahan. 1998. The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J.Immunol.* 160:5669-5675.
319. Lehmann,C., M.Zeis, N.Schmitz, and L.Uharek. 2000. Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells. *Blood* 96:594-600.
320. Kurokawa,H., K.Nishio, H.Fukumoto, A.Tomonari, T.Suzuki, and N.Saijo. 1999. Alteration of caspase-3 (CPP32/Yama/apopain) in wild-type MCF-7, breast cancer cells. *Oncol.Rep.* 6:33-37.
321. Fulda,S., M.U.Kufer, E.Meyer, F.van Valen, B.Dockhorn-Dworniczak, and K.M.Debatin. 2001. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 20:5865-5877.
322. Hopkins-Donaldson,S., J.L.Bodmer, K.B.Bourloud, C.B.Brognaara, J.Tschopp, and N.Gross. 2000. Loss of caspase-8 expression in neuroblastoma is related to malignancy and resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Med.Pediatr.Oncol.* 35:608-611.
323. Hopkins-Donaldson,S., J.L.Bodmer, K.B.Bourloud, C.B.Brognaara, J.Tschopp, and N.Gross. 2000. Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res.* 60:4315-4319.

324. Shin, M.S., H.S.Kim, C.S.Kang, W.S.Park, S.Y.Kim, S.N.Lee, J.H.Lee, J.Y.Park, J.J.Jang, C.W.Kim, S.H.Kim, J.Y.Lee, N.J.Yoo, and S.H.Lee. 2002. Inactivating mutations of CASP10 gene in non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 99:4094-4099.
325. Park, W.S., J.H.Lee, M.S.Shin, J.Y.Park, H.S.Kim, J.H.Lee, Y.S.Kim, S.N.Lee, W.Xiao, C.H.Park, S.H.Lee, N.J.Yoo, and J.Y.Lee. 2002. Inactivating mutations of the caspase-10 gene in gastric cancer. *Oncogene* 21:2919-2925.
326. Ambrosini, G., C.Adida, and D.C.Altieri. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat.Med.* 3:917-921.
327. Griffith, T.S. and D.H.Lynch. 1998. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr.Opin.Immunol.* 10:559-563.
328. Schlapbach, R., K.S.Spanaus, U.Malipiero, S.Lens, A.Tasinato, J.Tschopp, and A.Fontana. 2000. TGF-beta induces the expression of the FLICE-inhibitory protein and inhibits Fas-mediated apoptosis of microglia. *Eur.J.Immunol.* 30:3680-3688.
329. Uren, A.G., L.Wong, M.Pakusch, K.J.Fowler, F.J.Burrows, D.L.Vaux, and K.H.Choo. 2000. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr.Biol.* 10:1319-1328.
330. Yang, L., Z.Cao, H.Yan, and W.C.Wood. 2003. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Res.* 63:6815-6824.
331. Medema, J.P., J.de Jong, L.T.Peltenburg, E.M.Verdegaal, A.Gorter, S.A.Bres, K.L.Franken, M.Hahne, J.P.Albar, C.J.Melief, and R.Offringa. 2001. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:11515-11520.
332. Dhein, J., H.Walczak, C.Baumler, K.M.Debatin, and P.H.Krammer. 1995. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373:438-441.
333. Takahashi, T., M.Tanaka, C.I.Brannan, N.A.Jenkins, N.G.Copeland, T.Suda, and S.Nagata. 1994. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76:969-976.

334. Fisher, G.H., F.J. Rosenberg, S.E. Straus, J.K. Dale, L.A. Middleton, A.Y. Lin, W. Strober, M.J. Lenardo, and J.M. Puck. 1995. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81:935-946.
335. Puck, J.M. and M.C. Sneller. 1997. ALPS: an autoimmune human lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Semin. Immunol.* 9:77-84.
336. Rieux-Laucat, F., F. Le Deist, C. Hivroz, I.A. Roberts, K.M. Debatin, A. Fischer, and J.P. de Villartay. 1995. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268:1347-1349.
337. Wang, J., L. Zheng, A. Lobito, F.K. Chan, J. Dale, M. Sneller, X. Yao, J.M. Puck, S.E. Straus, and M.J. Lenardo. 1999. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 98:47-58.
338. Goransdotter, E.K., B. Fadeel, S. Nilsson-Ardnor, C. Soderhall, A. Samuelsson, G. Janka, M. Schneider, A. Gurgey, N. Yalman, T. Revesz, R. Egeler, K. Jahnuainen, I. Storm-Mathiesen, A. Haraldsson, J. Poole, B.G. de Saint, M. Nordenskjold, and J. Henter. 2001. Spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am. J. Hum. Genet.* 68:590-597.
339. Tisch, R. and H. McDevitt. 1996. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85:291-297.
340. Kagi, D., F. Vignaux, B. Ledermann, K. Burki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner, and P. Golstein. 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265:528-530.
341. Benoist, C. and D. Mathis. 1997. Cell death mediators in autoimmune diabetes - no shortage of suspects. *Cell* 89:1-3.
342. Martin, R., H.F. McFarland, and D.E. McFarlin. 1992. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 10:153-187.
343. Bauer, J., S.R. Ruuls, I. Huitinga, and C.D. Dijkstra. 1996. The role of macrophage subpopulations in autoimmune disease of the central nervous system. *Histochem. J.* 28:83-97.

344. Olsson, T. 1995. Critical influences of the cytokine orchestration on the outcome of myelin antigen-specific T-cell autoimmunity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol.Rev.* 144:245-268.
345. Malipiero, U., K.Frei, K.S.Spanaus, C.Agresti, H.Lassmann, M.Hahne, J.Tschopp, H.P.Eugster, and A.Fontana. 1997. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis is chronic/relapsing in perforin knockout mice, but monophasic in Fas- and Fas ligand-deficient *lpr* and *gld* mice. *Eur.J.Immunol.* 27:3151-3160.
346. Sabelko, K.A., K.A.Kelly, M.H.Nahm, A.H.Cross, and J.H.Russell. 1997. Fas and Fas ligand enhance the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis, but are not essential for immune privilege in the central nervous system. *J.Immunol.* 159:3096-3099.
347. Waldner, H., R.A.Sobel, E.Howard, and V.K.Kuchroo. 1997. Fas- and FasL-deficient mice are resistant to induction of autoimmune encephalomyelitis. *J.Immunol.* 159:3100-3103.
348. D'Souza, S.D., B.Bonetti, V.Balasingam, N.R.Cashman, P.A.Barker, A.B.Troutt, C.S.Raine, and J.P.Antel. 1996. Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J.Exp.Med.* 184:2361-2370.
349. Dowling, P., G.Shang, S.Raval, J.Menonna, S.Cook, and W.Husar. 1996. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain. *J.Exp.Med.* 184:1513-1518.
350. Miyasaka, N., T.Nakamura, I.J.Russell, and N.Talal. 1984. Interleukin 2 deficiencies in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 31:109-117.
351. Kong, L., N.Ogawa, T.Nakabayashi, G.T.Liu, E.D'Souza, H.S.McGuff, D.Guerrero, N.Talal, and H.Dang. 1997. Fas and Fas ligand expression in the salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 40:87-97.
352. Kong, L., C.P.Robinson, A.B.Peck, N.Vela-Roch, K.M.Sakata, H.Dang, N.Talal, and M.G.Humphreys-Beher. 1998. Inappropriate apoptosis of salivary and

- lacrimal gland epithelium of immunodeficient NOD-scid mice.
Clin.Exp.Rheumatol. 16:675-681.
353. Kotani,T., Y.Aratake, K.Hirai, Y.Fukazawa, H.Sato, and S.Ohtaki. 1995. Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity* 20:231-236.
354. Weetman,A.P. and A.M.McGregor. 1994. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocr.Rev.* 15:788-830.
355. Dayan,C.M. and G.H.Daniels. 1996. Chronic autoimmune thyroiditis. *N.Engl.J.Med.* 335:99-107.
356. Stassi,G. and R.De Maria. 2002. Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nat.Rev.Immunol.* 2:195-204.
357. Firestein,G.S., M.Yeo, and N.J.Zvaifler. 1995. Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J.Clin.Invest* 96:1631-1638.
358. Nakajima,T., H.Aono, T.Hasunuma, K.Yamamoto, T.Shirai, K.Hirohata, and K.Nishioka. 1995. Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 38:485-491.
359. Tsuboi,M., K.Eguchi, A.Kawakami, N.Matsuoka, Y.Kawabe, T.Aoyagi, K.Maeda, and S.Nagataki. 1996. Fas antigen expression on synovial cells was down-regulated by interleukin 1 beta. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 218:280-285.
360. Kawakami,A., K.Eguchi, N.Matsuoka, M.Tsuboi, Y.Kawabe, T.Aoyagi, and S.Nagataki. 1996. Inhibition of Fas antigen-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells in vitro by transforming growth factor beta 1. *Arthritis Rheum.* 39:1267-1276.
361. Hasunuma,T., N.Kayagaki, H.Asahara, S.Motokawa, T.Kobata, H.Yagita, H.Aono, T.Sumida, K.Okumura, and K.Nishioka. 1997. Accumulation of soluble Fas in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 40:80-86.
362. Tak,P.P., L.Spaeny-Dekking, M.C.Kraan, F.C.Breedveld, C.J.Froelich, and C.E.Hack. 1999. The levels of soluble granzyme A and B are elevated in

plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA).
Clin.Exp.Immunol. 116:366-370.

363. Utz,P.J., T.J.Gensler, and P.Anderson. 2000. Death, autoantigen modifications, and tolerance. *Arthritis Res.* 2:101-114.
364. Casciola-Rosen,L.A., G.Anhalt, and A.Rosen. 1994. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J.Exp.Med.* 179:1317-1330.
365. Casciola-Rosen,L.A., D.K.Miller, G.J.Anhalt, and A.Rosen. 1994. Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J.Biol.Chem.* 269:30757-30760.
366. Miossec,C., V.Dutilleul, F.Fassy, and A.Diu-Hercend. 1997. Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation. *J.Biol.Chem.* 272:13459-13462.
367. Zhang,J., D.Cado, A.Chen, N.H.Kabra, and A.Winoto. 1998. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392:296-300.
368. Newton,K., A.W.Harris, M.L.Bath, K.G.Smith, and A.Strasser. 1998. A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO J.* 17:706-718.
369. Yokota,S., T.D.Geppert, and P.E.Lipsky. 1988. Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor-alpha. *J.Immunol.* 140:531-536.
370. Alderson,M.R., R.J.Armitage, E.Maraskovsky, T.W.Tough, E.Roux, K.Schooley, F.Ramsdell, and D.H.Lynch. 1993. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 178:2231-2235.
371. Kennedy,N.J., T.Kataoka, J.Tschopp, and R.C.Budd. 1999. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J.Exp.Med.* 190:1891-1896.

372. Karin, M. and Y. Ben-Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18:621-663.
373. Micheau, O., S. Lens, O. Gaide, K. Alevizopoulos, and J. Tschopp. 2001. NF- κ B signals induce the expression of c-FLIP. *Mol. Cell Biol.* 21:5299-5305.
374. Stehlik, C., R. de Martin, I. Kumabashiri, J. A. Schmid, B. R. Binder, and J. Lipp. 1998. Nuclear factor (NF)- κ B-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 188:211-216.
375. Yeh, J. H., S. C. Hsu, S. H. Han, and M. Z. Lai. 1998. Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. *J. Exp. Med.* 188:1795-1802.
376. Holmstrom, T. H., I. Schmitz, T. S. Soderstrom, M. Poukkula, V. L. Johnson, S. C. Chow, P. H. Krammer, and J. E. Eriksson. 2000. MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *EMBO J.* 19:5418-5428.
377. Panka, D. J., T. Mano, T. Suhara, K. Walsh, and J. W. Mier. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 276:6893-6896.
378. Burr, J. S., N. D. Savage, G. E. Messah, S. L. Kimzey, A. S. Shaw, R. H. Arch, and J. M. Green. 2001. Cutting edge: distinct motifs within CD28 regulate T cell proliferation and induction of Bcl-XL. *J. Immunol.* 166:5331-5335.
379. Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmund, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis, and M. E. Greenberg. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-868.
380. Stahl, M., P. F. Dijkers, G. J. Kops, S. M. Lens, P. J. Coffey, B. M. Burgering, and R. H. Medema. 2002. The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J. Immunol.* 168:5024-5031.

381. Datta,S.R., H.Dudek, X.Tao, S.Masters, H.Fu, Y.Gotoh, and M.E.Greenberg. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241.
382. Cardone,M.H., N.Roy, H.R.Stennicke, G.S.Salvesen, T.F.Franke, E.Stanbridge, S.Frisch, and J.C.Reed. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-1321.
383. Sun,C., M.Cai, A.H.Gunasekera, R.P.Meadows, H.Wang, J.Chen, H.Zhang, W.Wu, N.Xu, S.C.Ng, and S.W.Fesik. 1999. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature* 401:818-822.
384. Potempa,J., E.Korzus, and J.Travis. 1994. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J.Biol.Chem.* 269:15957-15960.
385. O'Reilly,L.A., D.C.Huang, and A.Strasser. 1996. The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *EMBO J.* 15:6979-6990.
386. Chun,H.J., L.Zheng, M.Ahmad, J.Wang, C.K.Speirs, R.M.Siegel, J.K.Dale, J.Puck, J.Davis, C.G.Hall, S.Skoda-Smith, T.P.Atkinson, S.E.Straus, and M.J.Lenardo. 2002. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419:395-399.
387. Salmena,L., B.Lemmers, A.Hakem, E.Matysiak-Zablocki, K.Murakami, P.Y.Au, D.M.Berry, L.Tamblyn, A.Shehabeldin, E.Migon, A.Wakeham, D.Bouchard, W.C.Yeh, J.C.McGlade, P.S.Ohashi, and R.Hakem. 2003. Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev.* 17:883-895.
388. Baud,V. and M.Karin. 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11:372-377.
389. Cerretti,D.P., C.J.Kozlosky, B.Mosley, N.Nelson, K.Van Ness, T.A.Greenstreet, C.J.March, S.R.Kronheim, T.Druck, L.A.Cannizzaro, and . 1992. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256:97-100.
390. Gu,Y., K.Kuida, H.Tsutsui, G.Ku, K.Hsiao, M.A.Fleming, N.Hayashi, K.Higashino, H.Okamura, K.Nakanishi, M.Kurimoto, T.Tanimoto, R.A.Flavell,

- V.Sato, M.W.Harding, D.J.Livingston, and M.S.Su. 1997. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* 275:206-209.
391. Kuida,K., J.A.Lippke, G.Ku, M.W.Harding, D.J.Livingston, M.S.Su, and R.A.Flavell. 1995. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267:2000-2003.
392. Li,P., H.Allen, S.Banerjee, S.Franklin, L.Herzog, C.Johnston, J.McDowell, M.Paskind, L.Rodman, J.Salfeld, and . 1995. 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.
393. Wang,S., M.Miura, Y.K.Jung, H.Zhu, E.Li, and J.Yuan. 1998. Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* 92:501-509.
394. Wu,D.M., Y.Zhang, N.A.Parada, H.Kornfeld, J.Nicoll, D.M.Center, and W.W.Cruikshank. 1999. Processing and release of IL-16 from CD4+ but not CD8+ T cells is activation dependent. *J.Immunol.* 162:1287-1293.
395. Snapper,S.B., F.S.Rosen, E.Mizoguchi, P.Cohen, W.Khan, C.H.Liu, T.L.Hagemann, S.P.Kwan, R.Ferrini, L.Davidson, A.K.Bhan, and F.W.Alt. 1998. Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation. *Immunity.* 9:81-91.
396. Gervais,F.G., N.A.Thornberry, S.C.Ruffolo, D.W.Nicholson, and S.Roy. 1998. Caspases cleave focal adhesion kinase during apoptosis to generate a FRNK-like polypeptide. *J.Biol.Chem.* 273:17102-17108.
397. Zhou,B.B., H.Li, J.Yuan, and M.W.Kirschner. 1998. Caspase-dependent activation of cyclin-dependent kinases during Fas-induced apoptosis in Jurkat cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:6785-6790.
398. Chen,G., L.Shi, D.W.Litchfield, and A.H.Greenberg. 1995. Rescue from granzyme B-induced apoptosis by Wee1 kinase. *J.Exp.Med.* 181:2295-2300.
399. Park,J.A., K.W.Kim, S.I.Kim, and S.K.Lee. 1998. Caspase 3 specifically cleaves p21WAF1/CIP1 in the earlier stage of apoptosis in SK-HEP-1 human hepatoma cells. *Eur.J.Biochem.* 257:242-248.

400. Olson, N.E., J.D.Graves, G.L.Shu, E.J.Ryan, and E.A.Clark. 2003. Caspase activity is required for stimulated B lymphocytes to enter the cell cycle. *J.Immunol.* 170:6065-6072.
401. Woo, M., R.Hakem, C.Furlonger, A.Hakem, G.S.Duncan, T.Sasaki, D.Bouchard, L.Lu, G.E.Wu, C.J.Paige, and T.W.Mak. 2003. Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. *Nat.Immunol.* 4:1016-1022.
402. Micheau, O. and J.Tschopp. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114:181-190.
403. Klas, C., K.M.Debatin, R.R.Jonker, and P.H.Krammer. 1993. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int.Immunol.* 5:625-630.