



THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Cancérologie*

Présentée et soutenue par *Elodie LAFONT*
Le 10 Novembre 2011

Titre : *Rôles des caspases initiatrices et des sphingomyéline synthases dans l'apoptose induite par CD95L et TRAIL.*

JURY

M. Olivier MICHEAU (*Chargé de Recherche, INSERM U866, Dijon*) : Président du Jury
M. Frédéric RIEUX-LAUCAT (*Directeur de Recherche, INSERM U768, Paris*)
M. Hervé BENOIST (*Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse III*)
M. Bruno SEGUI (*Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse III*)

Membre invité :

Mme. Marie-Antoinette BERTRAND (*Maître de Conférences, Université Paul Sabatier, Toulouse III*)

Ecole doctorale : *Biologie, Santé, Biotechnologies*
Unité de recherche : *INSERM UMR 1037, CRCT*
Directeur(s) de Thèse : *M. Hervé BENOIST et M. Bruno SEGUI*
Rapporteurs : *M. Olivier MICHEAU et M. Frédéric RIEUX-LAUCAT*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse : le Dr. Olivier Micheau, le Dr. Frédéric Rieux-Laucat et le Dr. Marie-Antoinette Bertrand, je vous remercie pour l'intérêt que vous portez à ce travail, pour vos propositions d'amélioration du manuscrit et pour la discussion enrichissante que nous avons eu au cours de la soutenance.

Je remercie en premier lieu mes deux « chefs », le Pr. Bruno Ségui et le Pr. Hervé Benoist : Bruno, je te remercie de m'avoir choisi pour continuer ce travail pour mon M2R Cancérologie puis pour cette thèse. Je te remercie pour tous les conseils prodigués au cours de ces 4 années et pour nos diverses discussions scientifiques. Merci aussi pour la confiance et l'autonomie que tu as su peu à peu m'accorder et qui m'ont permis d'évoluer au cours de cette thèse. Enfin, je te remercie pour ton optimisme à toute épreuve, pour tes encouragements et pour ton honnêteté intellectuelle et j'espère un jour avoir l'opportunité de collaborer avec toi. Hervé, je vous remercie pour les questions scientifiques que vous avez su soulever et pour votre regard un peu plus « externe » sur ce sujet de recherche. Je tiens également à vous remercier pour vos qualités humaines : pour votre humour, votre bienveillance et votre sympathie qui sont des qualités précieuses au quotidien.

Je tiens aussi à remercier le Pr. Thierry Levade et le Dr. Nathalie Andrieu-Abadie : Thierry, je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de cette équipe et de m'avoir initié à la connaissance du monde des sphingolipides. Vous avez toujours su vous rendre disponible pour répondre à mes interrogations et je vous suis très reconnaissante de l'aide que vous m'avez apporté au cours de cette thèse. Je reste admirative de votre connaissance encyclopédique de la Biologie et de vos qualités pédagogiques. Nul doute que vos qualités humaines contribuent également largement à l'ambiance particulièrement sympathique qui règne au sein de cette équipe. Nathalie, je te remercie pour les conseils et les questions scientifiques toujours enrichissant(e)s que tu as su prodiguer face à nos résultats expérimentaux. Merci pour ton calme et ta discrétion.

Je tiens à remercier le Dr. Marie-Antoinette Bertrand : Manou, je vous remercie de tous les conseils pédagogiques que vous m'avez prodigués au cours de mon monitorat. Je vous remercie aussi sincèrement pour votre incroyable gentillesse, votre sens de l'équité et votre empathie ainsi que pour toute la confiance que vous m'avez accordée.

Je tiens également à remercier nos différents collaborateurs internationaux et nationaux et plus particulièrement le Dr. Olivier Micheau et le Dr. Patrick Legembre pour les différents outils qu'ils nous ont fournis et surtout pour leurs précieux conseils scientifiques. Merci également au Dr. Alexandre Morizot et au Dr. Benjamin Chaigne-Delalande pour leurs conseils techniques.

Un très grand merci aux différents ITA de l'équipe : Nicole, notre M2R 2012, merci pour ta bonne humeur, ta douceur et ton incroyable disponibilité. Merci aussi pour ton écoute et ta discrétion. Merci pour tous tes conseils techniques et pour ton expertise en cytométrie. Patricia, je te remercie pour tous les bons moments passés en T.P en ton agréable compagnie et pour ta capacité à activer tes réseaux pour nous déguster les produits manquants. Merci pour l'aide en Western ;) . Stéphane, je te remercie pour ton aide en biochimie des lipides et pour les discussions animées autour d'un café. Merci de m'avoir fait découvrir les spéculoos. Virginie G., merci pour ton aide pour mes rares venues en Biologie Moléculaire. Merci aussi pour ta rigueur (si, si, on râle, mais au fond, on sait tous que tu as raison ;)).

Je tiens également à remercier les différentes post-doc que j'ai croisé au cours de ma thèse : Sandra (tu vois je t'ai mis dans les post-docs !), je te remercie pour tes conseils scientifiques et pour ta gentillesse (bien cachée sous ton caractère bien trempé ;)) Caro, Carmen et Fred, le superbe trio des post-docs, un très grand merci pour vos conseils, votre bonne humeur, vos encouragements et votre disponibilité. Florie, je n'ai pas encore eu beaucoup le temps de te connaître, mais j'apprécie ta compagnie et je te souhaite tout le meilleur pour la suite.

Un grand merci à tous les étudiants de la sphingolipids' team que j'ai croisé au cours de ma thèse : Anne, Delphine, Julie, Claire, Marie-Lise, Guillaume, Yahya, Sandrine, Rita, Johann, Romain et Virginie A, Julia, Leonardo.... Merci aussi à Magali et à Cindy de l'équipe 10 pour leur sympathie. De façon + générale aux girls de l'équipe : un grand merci pour cette ambiance exceptionnelle, pour les bonnes soirées de préparation de thèse (ou pas) passées ensemble, tout ça va me manquer. Un très grand merci pour cette superbe chanson et pour votre magnifique power point.

Virginie A., ma petite Binette, je te remercie pour tous les bons moments passés ensemble et pour ta tolérance face à mes matins chagrins. Nul doute, tu es vraiment facile à vivre poulette et je suis sûre que tu vas finir cette thèse avec brio.

Avec Binette, vient forcément ML, Bats (ou Zats ?), the pharmacienne, un grand merci pour ta bonne humeur à toute épreuve, pour les potins frais à chaque nouvelle semaine et pour ta gouaille.

Anne, merci beaucoup pour ta gentillesse, pour ton calme exceptionnel (un véritable flegme), merci pour tous les conseils scientifiques et plus personnels. J'ai hâte de te recroiser à Londres :)

Delphine, je te remercie pour ta sympathie et pour tout le travail que tu as réalisé avant mon arrivée et qui a sans aucun doute contribué à la réussite de cette thèse.

Guillaume, merci pour ta bonne humeur et bienvenue dans ce nouveau sujet... tu vas te régaler :)

Julie, je suis contente de te connaître, un grand merci pour m'avoir fait découvrir ce mythique restaurant libanais et pour ta sympathique soirée de thèse.

A Léo, Dr House, notre éternel lover, notre indémodable romantique, merci pour les discussions aux P2, en semaine ou le Dimanche, comme chacun sait, tu as un avis sur

tout, et surtout un avis ;)

Yahya, merci d'avoir supporté toutes nos discussions de filles au sein du bureau. La hotte du milieu reste à jamais la tienne ;).

A ma Julia, ma Rochotte, mon Poniou (le pitit poney qu'il est bien de chiz nous), un énorme MERCI. Je suis ravie de t'avoir rencontré et je te remercie pour ta tolérance, ton empathie, ta générosité. Tu es une super nana (et arrête de rougir, je te vois), l'écrevette le sait, la coquine.

Merci au petit poussin tout neuf, Claire, le peu que je connaisse de toi augure que du bon, bon courage pour ta thèse.

A mes deux adorables stagiaires, Johann et Romain, un très grand merci pour votre aide et votre motivation. Je vous souhaite toute la réussite possible pour vos carrières à venir.

A mes amis, en particulier Emilie, Mathieu, Adeline, Raouîa, Najat, Sophie et Delphine : Merci de m'avoir supporté pendant ces trois ans de thèse, merci de votre compréhension face à mon indisponibilité notoire (j'peux pas, j'ai labo^^), merci pour votre bonne humeur !

Un grand merci à Delphine et Sophie : Fifine, the girl from the Gers, merci beaucoup, pour ta franchise, ton optimisme et pour ta capacité à nous remettre les idées en place quand c'est nécessaire. J'ai hâte de voir ta brillante soutenance poulette ! Soso, ma meilleure amie, tu es une grande femme, merci pour ta finesse intellectuelle et relationnelle, pour ton empathie hors du commun, pour les jolis moments passés et ceux à venir, pour les soirées où on refait le monde, pour les toiles (et les choix de films + ou – audacieux !) et pour cette chanson superbe !!

Merci à la Pistre family, Thierry, Anne-Marie, Pierra et Benji, qui m'ont vu grandir, je suis ravie que vous ayez pu assister à cette soutenance et je vous remercie pour tous les bons souvenirs (passés et à venir !) en votre compagnie.

Je tiens à remercier tous les membres de ma famille qui m'ont supporté au cours de ces trois ans de thèse :

A mes grands-parents : mamie Gaby, papi Marcel et mamie Didi, je vous remercie pour votre soutien et pour tous les moments agréables passés en votre compagnie tout au long de ma vie. A tonton Jacques, à Josette et à Anne, merci beaucoup d'avoir été présents pour ma soutenance, merci pour votre gentillesse tout au long de ces années.

A mon frèrot, mon Googie, merci d'être là, dans les petits moments comme dans les grands, merci pour les jeux de mots audacieux (tu m'as tout appris^^), merci pour le soutien que tu m'apportes quand je doute. Mon frèrot, tu es taupeuh !

Thank you to Max and Connie, the German part of our family, I'm delighted to take a break and get to know you a little more every summer.

A mes parents, Cathy et Michel, Mamounette et Papounet, je vous remercie pour votre soutien au cours de cette thèse, pour votre compréhension et votre écoute face à mes difficultés. Merci pour vos conseils judicieux en toutes circonstances. Merci pour tout ce que vous m'enseignez jour après jour et pour tous les bons souvenirs engrangés. Le meilleur reste à venir et Londres ce n'est pas si loin !

Merci à toi Loïc, mon coeur, pour ta précieuse présence ces derniers mois. Merci de me comprendre et de me soutenir dans mes choix. Merci d'être là pour moi, tout simplement.

A mon papi Irénée.

SOMMAIRE

| | |
|---|----------|
| RESUME EN FRANCAIS | 1 |
| RESUME EN ANGLAIS | 2 |
| INTRODUCTION | 3 |
| I. La mort cellulaire dépendante des récepteurs de mort | 3 |
| I.1. Les différents types de mort cellulaire : présentation générale..... | 3 |
| I.2. L'apoptose..... | 3 |
| I.2.1. L'apoptose : découverte et principales caractéristiques..... | 3 |
| I.2.1.1. Introduction..... | 3 |
| I.2.1.2. Caractéristiques morphologiques..... | 4 |
| I.2.1.3. Découverte des principaux acteurs moléculaires..... | 6 |
| I.2.2. Les caspases..... | 6 |
| I.2.2.1. Définition et activité catalytique..... | 6 |
| I.2.2.2. Structure et classification..... | 7 |
| I.2.3. La voie extrinsèque ou dépendante des récepteurs de mort..... | 9 |
| I.2.3.1. Structure et rôles physiologiques des ligands et des récepteurs de mort..... | 9 |
| I.2.3.1.1. Présentation de la famille des récepteurs de mort et de leurs ligands..... | 9 |
| I.2.3.1.2. CD95 et CD95L..... | 11 |
| I.2.3.1.2.1. Structure du récepteur..... | 11 |
| I.2.3.1.2.2. Structure de CD95L/FasL..... | 12 |
| I.2.3.2.2.3. Expression de CD95 et CD95L et principaux rôles physiologiques du système CD95/CD95L..... | 13 |
| I.2.3.1.3. DcR3..... | 19 |
| I.2.3.1.4. TRAIL et ses récepteurs..... | 19 |
| I.2.3.1.4.1. Structure de TRAIL et de ses récepteurs..... | 19 |
| I.2.3.1.4.2. Expression et rôles physiologiques de TRAIL et de ses récepteurs..... | 21 |
| I.2.3.2. Signalisation apoptotique émanant des récepteurs de mort..... | 25 |
| I.2.3.2.1. La formation du DISC, l'activation et le rôle des caspases initiateuses 2, 8 et 10 dans la signalisation apoptotique émanant des récepteurs de mort..... | 25 |
| I.2.3.2.2. Les événements membranaires : l'initiation membranaire du signal et l'internalisation des récepteurs de mort..... | 29 |
| I.2.4. La voie intrinsèque..... | 32 |
| I.2.4.1. Présentation des membres de la famille de Bcl-2..... | 33 |
| I.2.4.2. Les mécanismes de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale..... | 36 |
| I.2.4.3. Les facteurs mitochondriaux relargués..... | 39 |
| I.2.4.4. La formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9..... | 39 |
| I.2.4.5. Le PIDDosome et l'activation de la caspase 2..... | 41 |
| I.2.5. Activation des caspases effectrices et « execution » de l'apoptose..... | 43 |
| I.2.5.1. Mode d'activation des caspases effectrices..... | 43 |
| I.2.5.2. Substrats des caspases et rôle dans le démantèlement cellulaire..... | 44 |
| I.2.5.3. Autres protéases impliquées dans l'apoptose..... | 47 |
| I.2.6. Les deux types de réponse cellulaire aux ligands de mort : type I et type II..... | 48 |
| I.2.7. Mécanismes de régulation de l'apoptose induite par les DR : les inhibiteurs de caspases et l'effet de certaines chimiothérapies..... | 51 |
| I.2.7.1. Inhibiteurs des caspases d'origine virale ou cellulaire..... | 51 |
| I.2.7.1.1. CrmA, p35 et p49..... | 51 |
| I.2.7.1.2. Les protéines vFLIP et cFLIP..... | 52 |
| I.2.7.1.3. Les IAPs..... | 52 |
| I.2.7.2. Inhibiteurs chimiques ou synthétiques des caspases..... | 53 |
| I.2.7.3. Régulation de la mort DR dépendante par la chimiothérapie..... | 54 |
| I.3. Signalisations cytotoxiques caspase-indépendante, émanant des récepteurs de mort..... | 55 |
| I.4. Autres rôles et signalisations, non cytotoxiques, mises en jeu par les DR..... | 58 |
| I.4.1. Autres rôles et signalisations médiées par les récepteurs de TRAIL..... | 58 |
| I.4.2. Autres rôles et signalisations médiées par CD95..... | 60 |
| I.5. Potentiel thérapeutique de l'utilisation d'agonistes des DR en cancérologie..... | 62 |

| | |
|---|------------|
| II. Les sphingolipides | 65 |
| II.1. Structure et métabolisme..... | 65 |
| II.1.1. Structure des sphingolipides..... | 65 |
| II.1.2. Métabolisme et localisation des enzymes du métabolisme sphingolipidique..... | 67 |
| II.1.2.1. Anabolisme des sphingolipides..... | 67 |
| II.1.2.2. Catabolisme des sphingolipides..... | 72 |
| II.2. Conséquences pathologiques des altérations du métabolisme sphingolipidique : les sphingolipidoses..... | 74 |
| II.3. Principaux rôles des sphingolipides dans la signalisation cellulaire..... | 78 |
| II.3.1. Introduction : divers rôles des SLs dans la signalisation cellulaire..... | 78 |
| II.3.2. Fonction des sphingolipides dans la mort cellulaire : rôle du céramide dans la cytotoxicité..... | 79 |
| II.3.2.1. Généralités..... | 79 |
| II.3.2.2. Rôle du céramide dans la réponse aux ligands des récepteurs de mort..... | 84 |
| II.3.2.2.1. Rôle du céramide dans la réponse à CD95L..... | 85 |
| II.3.2.2.2. Rôle du céramide dans la réponse à TRAIL et au TNF..... | 87 |
| II.4. Les sphingomyéline synthases | 88 |
| II.4.1. Structure et activité catalytique..... | 88 |
| II.4.2. Phénotypes des souris déficientes en sphingomyéline synthases..... | 90 |
| II.4.3. Régulation de l'activité sphingomyéline synthase..... | 90 |
| II.4.4. Influence de l'activité SMS sur la survie cellulaire..... | 93 |
| II.4.4.1. La synthèse de sphingomyéline favorise la survie cellulaire..... | 93 |
| II.4.4.2. La synthèse de sphingomyéline favorise la mort cellulaire..... | 95 |
| III. Objectif général de la thèse | 97 |
| MATERIELS ET METHODES | 98 |
| I. Culture et lignées cellulaires | 98 |
| I-1 Cellules Jurkat..... | 98 |
| I-2 Cellules HeLa..... | 98 |
| I.3 Cellules Hct116 et SW480..... | 98 |
| II. Transfections cellulaires | 99 |
| II.1 Transfections transitoires..... | 99 |
| II.2 Transfections stables..... | 99 |
| III. Génération des cellules HeLa, Hct116 et SW480 surexprimant la SMS1 de façon stable | 100 |
| IV. Source de FasL et de TRAIL | 100 |
| V. Western Blot | 101 |
| V.1. Préparation des extraits protéiques..... | 101 |
| V.2. Migration électrophorétique des extraits protéiques..... | 101 |
| VII. Test de viabilité cellulaire | 102 |
| VIII. Tests d'apoptose | 102 |
| VIII.1. Analyse morphologique..... | 102 |
| VIII.2. Analyse du relargage du cytochrome c..... | 103 |
| VIII.3. Analyse de l'externalisation des phosphatidylsérines et de la perméabilisation de la membrane plasmique par cytométrie de flux..... | 104 |
| VIII.4. Essais <i>in vitro</i> : évaluation du clivage de la SMS1 par les caspases..... | 104 |
| IX. Analyse des sphingolipides et de leur métabolisme | 104 |
| IX.1. Extraction lipidique selon la méthode de Folch..... | 104 |
| IX.2. Dosage du céramide et du DAG (méthode utilisant la DAG kinase)..... | 105 |
| IX.3. Dosage de la sphingomyéline..... | 105 |
| IX.4. Test d'activité <i>in situ</i> et <i>in vitro</i> SMS GCS..... | 106 |
| IX.4.1. Mesure de l'activité SMS <i>in situ</i> :..... | 106 |
| IX.4.2. Mesure de l'activité SMS <i>in vitro</i> :..... | 106 |
| X Immunocytofluorescence et microscopie confocale : analyse de la localisation des SMS | 107 |
| XI. Test de clonogénicité en agar | 107 |

| | |
|---|------------|
| XII. Anticorps utilisés..... | 108 |
| RESULTATS | 109 |
| I. Article 1 : La mort caspase-10 dépendante induite par CD95L n'est pas inhibée par l'inhibiteur des caspases zVAD-fmk..... | 109 |
| I.1. Contexte de l'article 1 :..... | 109 |
| I.2. Conclusion de l'article 1 :..... | 111 |
| II. Article 2 : L'inhibition caspase-dépendante de la synthèse de sphingomyéline est fonctionnellement impliquée dans la mort induite par CD95L..... | 114 |
| II.1. Contexte de l'article 2 :..... | 114 |
| II.2. Conclusion de l'article 2 :..... | 116 |
| III. La sphingomyéline synthase 1 inhibe l'apoptose induite par TRAIL dans les cellules cancéreuses..... | 121 |
| III.1. Contexte de l'étude :..... | 121 |
| III.2. Résultats préliminaires et perspectives expérimentales :..... | 122 |
| IV. Article 3 : Rôle de la caspase 9 dans l'apoptose induite par le céramide dans les cellules leucémiques T Jurkat..... | 134 |
| IV.1. Contexte de l'article 3 :..... | 134 |
| IV.2. Conclusion de l'article 3 :..... | 136 |
| DISCUSSION..... | 138 |
| ANNEXES..... | 150 |
| Liste des abréviations..... | 150 |
| Liste des publications..... | 153 |
| Article de revue : Régulation des signaux de croissance et de mort cellulaires à la membrane plasmique par la synthèse de sphingomyéline : implications dans les cancers hématologiques..... | 154 |
| REFERENCES | 155 |

RESUME EN FRANCAIS

La mort cellulaire par apoptose est un processus clef du développement embryonnaire et de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Il s'agit également d'un mécanisme effecteur mis en jeu dans la réponse immunitaire, notamment anti-tumorale. La liaison de ligands, en particulier TRAIL et CD95L, produits par des cellules du système immunitaire, sur des récepteurs de mort (DR pour Death Receptor), exprimés par les cellules tumorales, permet ainsi l'induction de l'apoptose de cellules sensibles. Ceci met en jeu différents événements dont le regroupement membranaire des DR, la formation du DISC (Death Inducing Signalling Complex), une perméabilisation mitochondriale et l'activation des caspases. De plus, le taux intracellulaire de céramide, un sphingolipide pro-apoptotique, augmente au cours de cette signalisation. Les mécanismes qui sous-tendent cette augmentation de céramide, et le rôle du céramide dans la signalisation apoptotique des DRs, restent encore méconnus. L'objectif de cette thèse a été de clarifier le rôle des caspases initiatrices et du céramide dans l'apoptose induite par CD95L et TRAIL. La caspase 10 est une caspase initiatrice, dont le rôle causal dans l'induction de mort par CD95L reste controversé. Nos travaux indiquent, d'une part, que cette protéase est bel et bien impliquée dans la mort induite par CD95L et, d'autre part, qu'elle joue un rôle important dans la mort induite par CD95L en présence de zVAD-fmk, un inhibiteur à spectre large des caspases. Dans une deuxième partie, nous montrons que la sphingomyéline synthase 1, responsable de la synthèse de sphingomyéline à partir de céramide, est inhibée dans la signalisation de CD95, par un mécanisme dépendant des caspases, notamment de la caspase initiatrice 8. La sphingomyéline synthase 1 modulerait l'induction de l'apoptose en réponse à CD95L et TRAIL. Ainsi, la surexpression de la SMS1 confère une protection vis-à-vis de la mort induite par TRAIL et CD95L, tandis que la diminution transitoire de son expression, par stratégie d'interférence à l'ARN, sensibilise plusieurs types de cellules cancéreuses. Nos résultats indiquent que le rôle protecteur de cette enzyme peut être dépendant de la modulation de la formation du DISC et de la voie mitochondriale de l'apoptose. Enfin, la SMS1 confère également une résistance vis-à-vis de la mort induite par des médicaments anticancéreux. L'inhibition de l'activité de synthèse de sphingomyéline pourrait donc être un moyen original de sensibiliser des cellules cancéreuses à la mort induite par des agonistes des DR, ou par des molécules de chimiothérapie, *via* la modulation potentielle de plusieurs étapes de la cascade apoptotique.

RESUME EN ANGLAIS

Apoptotic cell death is a major process during embryonic development and is necessary for tissue homeostasis in adults. It is also an effector mechanism involved in immune responses, and, particularly in anti-tumoral immune response. Binding of death receptors ligands, such as TRAIL and CD95L, which are produced by immune cells, on DR (Death Receptors) expressed by tumor cells, induces apoptosis in sensitive cells. This involves DR clustering, DISC (Death Inducing Signalling Complex) formation, mitochondrial permeabilization and caspases activation. Moreover, an increase of intracellular level of ceramide, a pro-apoptotic sphingolipid, has been observed during this signalling and might be involved in cell death induction. Mechanisms involved in these elevations and the exact role of ceramide in DRs apoptotic signalling are still unknown. The aim of this PhD was to clarify initiator caspases and ceramide roles in CD95L and TRAIL induced apoptosis. Initiator caspase 10 involvement in CD95L-induced cell death is still controversial. Our results indicate that this protease is indeed involved in CD95L-induced cell death and that it is also involved in CD95L induced cell death in the presence of zVAD-fmk, a broad-spectrum caspase inhibitor. Moreover, we show that sphingomyelin synthase 1, which is responsible for the synthesis of sphingomyelin from ceramide, is inhibited in CD95 signalling, in a caspase-dependent way, and more precisely in a caspase-8-dependent way. SMS1 could modulate CD95L- and TRAIL-induced cell death. Indeed, SMS1 overexpression is protective against CD95L- and TRAIL- induced cell death, whereas down-regulating SMS1 by RNA interference sensitizes several types of cancer cells. Our results point out that SMS1 protective role might depend on DISC formation and apoptotic mitochondrial pathway modulations. Lastly, SMS1 is also protective towards anti-cancer drugs. Sphingomyelin synthesis inhibition might therefore be an original way to sensitize cancer cells towards DR agonists, or anti-cancer drugs, *via* putative apoptotic signalling modulations at several steps.

INTRODUCTION

I. La mort cellulaire dépendante des récepteurs de mort.

I.1. Les différents types de mort cellulaire : présentation générale.

La mort cellulaire est un événement essentiel au cours du développement embryonnaire, puis tout au long de la vie d'un être humain, participant au maintien de l'homéostasie tissulaire et à l'élimination des cellules indésirables. On distingue plusieurs types de morts cellulaires, définis selon des critères morphologiques, biochimiques et fonctionnels. Historiquement, trois types de processus majoritaires pouvant mener à la mort de la cellule ont été identifiés. La nécrose, parfois nommée mort cellulaire « de type III », est morphologiquement caractérisée par une rupture précoce de la membrane plasmique, une oncose (gonflement de la cellule) et par une dilatation des organites cellulaires. Elle est classiquement considérée comme étant une mort « accidentelle », ayant lieu en réponse à des perturbations environnementales cellulaires telle que l'hypoxie, l'ischémie, des modifications drastiques de température extérieure ou l'exposition à des toxines. La nécrose est également promotrice d'inflammation. A l'inverse, la mort cellulaire par apoptose, ou mort cellulaire programmée « de type I » est une sorte de suicide cellulaire, pré-défini génétiquement. Enfin, la mort cellulaire qui survient parfois suite à un processus d'autophagie constitue la mort cellulaire programmée de « type II ». De plus, il existe de multiples morts alternatives ou atypiques mêlant des caractéristiques des différents types de mort mentionnés ci-dessus ainsi que des morts aux caractéristiques particulières, notamment l'entose récemment découverte (Overholtzer *et al.*, 2007), la cornification, la catastrophe mitotique, l'anoïkis, l'excitotoxicité et la dégénération Wallerienne, complexifiant régulièrement la classification proposée par le NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death) (Kroemer *et al.*, 2008). Les morts cellulaires faisant suite à l'activation des récepteurs de mort, et en particulier l'apoptose, seront plus largement décrites dans ce manuscrit.

I.2. L'apoptose.

I.2.1. L'apoptose : découverte et principales caractéristiques.

I.2.1.1. Introduction.

La mort cellulaire par apoptose est un phénomène physiologique indispensable au bon développement embryonnaire puis à la défense contre des agents pathogènes ainsi qu'au maintien de l'homéostasie tissulaire à l'âge adulte. On estime ainsi que « *Si les mitoses avaient lieu sans être compensées par la mort cellulaire (apoptotique), un humain posséderait 2 tonnes de moelle osseuse et de ganglions lymphatiques ainsi que 16 km d'intestin à l'âge de 80 ans* (Melino, 2001). » Quand elle est excessive, l'apoptose participe à l'émergence de pathologies neurodégénératives et de déficits immunitaires alors qu'un défaut d'apoptose favorise l'apparition de pathologies cancéreuses et auto-immunes (Yuan & Yankner, 2000 ; Thompson, 1995 ; Hanahan *et al.*, 2000 ; Green & Evan, 2002).

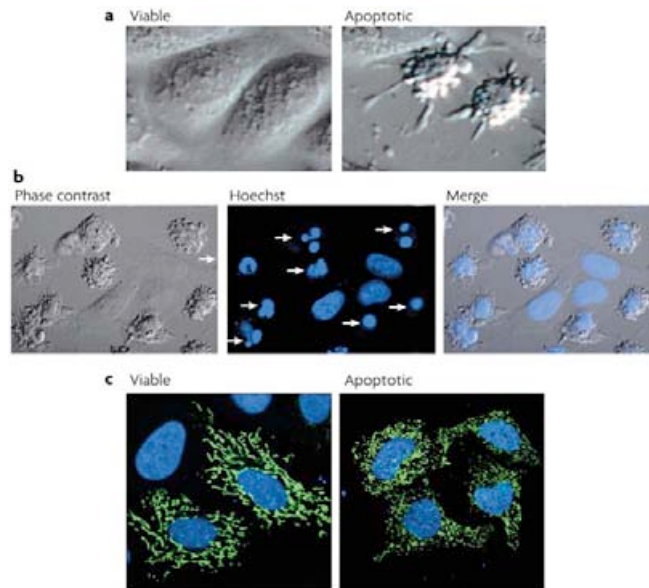
Dans les cellules de vertébrés, l'apoptose met en jeu l'activation d'une, voire deux, voies de signalisation, qualifiées d'intrinsèque et d'extrinsèque. La voie de signalisation intrinsèque met en jeu la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, tandis que la voie dite extrinsèque est dépendante de la stimulation des récepteurs dits « de mort ». Par souci de simplification, nous présenterons ces deux voies l'une après l'autre, mais elles ne sont pas nécessairement indépendantes et peuvent être connectées au cours de la signalisation induite par la liaison de ligands à leurs récepteurs de mort. Par ailleurs, ces deux voies conduisent à l'apparition des caractéristiques morphologiques identiques.

1.2.1.2. Caractéristiques morphologiques.

En 1972, Kerr, Currie et Wyllie décrivent pour la première fois l'apoptose, du grec *apoptosis*, terme décrivant la chute des pétales d'une fleur ou des feuilles d'un arbre (Kerr *et al.*, 1972). Ce phénomène fut initialement caractérisé morphologiquement (Wyllie *et al.*, 1980). Un arrondissement cellulaire et une réduction de la taille cellulaire ainsi qu'une condensation de la chromatine (phénomène nommé *pyknosis*), sont observés rapidement au cours de l'apoptose. On note aussi une fragmentation globale d'organites, qu'il s'agisse du noyau (phénomène de *karyorrhexis*), des réseaux golgiens, mitochondriaux ou du réticulum endoplasmique (Figure 1). Une fragmentation typique « en échelle » de la chromatine en multiples de 200 paires de bases, reflétant un clivage internucléosomal, peut parfois être détectée.

Figure 1 Caractéristiques morphologiques des cellules apoptotiques.

A : Cellules HeLa traitées par un agent inducteur d'apoptose. Les cellules apoptotiques ont une réduction de leur volume et leur membrane plasmique présente des évaginations. **B :** Les cellules HeLa traitées par un inducteur d'apoptose ont été marquées avec un marqueur nucléaire (Hoescht, en bleu). Les cellules apoptotiques (flèches) présentent une condensation et ou une fragmentation nucléaire. **C :** Les cellules HeLa ont été transfectées pour exprimer une protéine mitochondriale fusionnée à la GFP (Green Fluorescent Protein) puis traitées par un inducteur d'apoptose. Dans les cellules apoptotiques, on observe une fragmentation du réseau mitochondrial, passant d'un aspect filamenteux dans les cellules viables à un aspect plus ponctué pour les cellules en apoptose précoce (Taylor, Cullen et Martin 2008).



Enfin, à des stades avancés, la membrane plasmique présente des évaginations (c'est le phénomène de blebbing, ou de *zeiosis*, c'est à dire de bourgeonnement), ce qui aboutit à une implosion de la cellule et à la formation de petits fragments vésiculaires, les corps apoptotiques. Les corps apoptotiques sont, *in vivo*, reconnus et éliminés par les phagocytes. Les phagocytes reconnaîtraient ces fragments cellulaires grâce à l'exposition des phosphatidylsérines, phospholipides présents sur le feuillet interne de la membrane plasmique, qui sont externalisées de façon précoce par les cellules apoptotiques (et qui demeurent donc sur le feuillet externe de la membrane des corps apoptotiques) (Fadok *et al.*, 1992). *In vitro*, on observe à des stades tardifs un phénomène de perméabilisation de la membrane plasmique, parfois qualifiée de « nécrose secondaire à l'apoptose ». Toutefois, *in vivo*, les cellules apoptotiques n'atteignent probablement pas ce stade, étant reconnues et éliminées en amont par les phagocytes. La mort cellulaire par apoptose ne conduirait donc généralement pas à une perméabilisation de la membrane plasmique *in vivo* et le contenu cellulaire, en opposition à la nécrose, n'est pas déversé dans le milieu extracellulaire. Cette différence expliquerait le fait que l'apoptose n'est pas inductrice d'inflammation. Au contraire, au cours de la nécrose certaines substances intracellulaires devenant extracellulaires induisent une réponse inflammatoire. De plus, la phagocytose de cellules apoptotiques par les macrophages favorise la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, en particulier de TGF- β , par ces phagocytes (Fadok *et al.*, 1998 ; Huynh *et al.*, 2002). Toutefois, l'apoptose, dans certains contextes, peut être immunogène (Green *et al.*, 2009).

1.2.1.3. Découverte des principaux acteurs moléculaires.

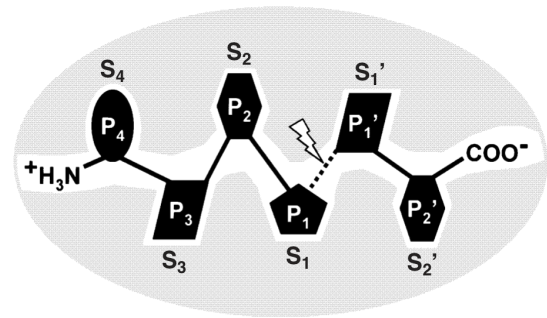
Au niveau moléculaire, dans les cellules de vertébrés, les deux voies de l'apoptose mettent notamment en jeu des protéases particulières, les caspases, dont l'activation, finement régulée, est à l'origine de plusieurs des différents phénomènes morphologiques décrits précédemment. Dans les années 1970, les travaux du groupe de Robert Horvitz chez le nématode *Caenorhabditis Elegans* ont permis d'identifier les principaux acteurs intervenant dans l'apoptose. En effet, 131 des 1090 cellules de ce ver sont systématiquement et physiologiquement éliminées par apoptose au cours du développement embryonnaire. L'étude de mutants chez ce ver a ainsi permis de découvrir les gènes CED (Cell-Death-abnormal), dont plus de 20 sont connus actuellement (Lettre & Hengartner, 2006). Ces gènes codent pour des protéines anti ou pro-apoptotiques dont des orthologues humains furent ensuite identifiés, indiquant une importante conservation des protéines impliquées dans ce phénomène au cours de l'évolution (Horvitz, 1999). Chez le nématode, 4 protéines, CED3, CED4, CED9 et Egl-1, sont primordiales pour la mort cellulaire. Les orthologues de CED3 chez les mammifères correspondent aux différentes caspases. Les orthologues de CED9 sont des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, une famille de protéines régulatrices de la voie mitochondriale de l'apoptose (cf. chapitre 1.2.4.1) (Hengartner & Horvitz, 1994), tandis que ceux de Egl-1 sont des membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Nehme & Conradt, 2008) (cf. chapitre 1.2.4.1). Enfin, l'homologue de CED4 est Apaf-1, un régulateur de la voie intrinsèque situé en aval de la mitochondrie (cf. chapitre 1.2.4.4) (Zou *et al.*, 1997). CED4, CED9 et Egl-1 participent donc toutes trois à la régulation de l'activation de CED3, orthologue des caspases humaines.

1.2.2. Les caspases.

1.2.2.1. Définition et activité catalytique.

Les caspases (pour cysteinyl-dependent aspartate specific proteases) sont une famille d'endopeptidases présentes dans tous les organismes multicellulaires. Elles furent nommées ainsi car elles clivent leurs substrats après un résidu aspartate et possèdent une cystéine au sein de leur site catalytique (Alnemri *et al.*, 1996). Les caspases reconnaissent spécifiquement 4 acides aminés contigus nommés P1-P2-P3 et P4 au sein de leurs substrats et clivent ces derniers en C-terminal du résidu P1, qui est toujours un résidu aspartate (Thornberry *et al.*, 1997 ; Fuentes-Prior & Salvesen, 2004) (Figure 2).

Figure 2 Nomenclature des sites de reconnaissance du substrat des caspases. Les acides aminés en N-terminal de l'aspartate (ou résidu P1), qui définissent la spécificité des différentes caspases, sont numérotés Px tandis que les acides aminés situés en C-terminal du résidu P1 sont numérotés P'x. Les différents résidus se logent dans une poche au sein des différentes caspases qui possèdent plusieurs sites de reconnaissance, chacun étant composé de plusieurs acides aminés. Ces sites sont numérotés Sx pour ceux qui accueillent des résidus en N-terminal du résidu P1 et S'x pour ceux accueillant des résidus en C-terminal de P1 (H Stennicke et G Salvesen 1999).



La cystéine catalytique, en position 285 selon la nomenclature correspondante à la caspase-1, joue le rôle de nucléophile, tandis que le résidu histidine 237 permettrait la protonation du groupement amine de l'acide aminé en position P1', c'est-à-dire en C-terminal du résidu P1 (Stennicke & Salvesen, 1999) (Figure 2).

1.2.2.2. Structure et classification.

La caspase-1, ou enzyme convertissant l'IL-1- β , fut la première caspase identifiée chez l'Homme. Son homologie avec la protéine CED3 a permis de comprendre le rôle de cette famille de protéases dans l'apoptose (Yuan *et al.*, 1993 ; Thornberry *et al.*, 1992 ; Cerretti *et al.*, 1992). En effet, bien que la caspase-1 a plus tard été classée comme caspase inflammatoire, sa surexpression dans des fibroblastes peut favoriser son activation et être inductrice d'apoptose (Miura *et al.*, 1993). On connaît actuellement 15 caspases chez les mammifères, 11 (ou 12) chez l'Homme, regroupées fonctionnellement en trois sous-groupes différents : les caspases inflammatoires ou impliquées dans la différenciation appelées caspases du groupe I (caspases 1, 4, 5, 12 et 14), les caspases apoptotiques initiatrices ou caspases du groupe II (caspases 2, 8, 9 et 10) et les caspases apoptotiques effectrices (ou exécutrices) ou caspases du groupe III (caspases 3, 6 et 7) (Figure 3).

En l'absence d'inducteur de mort, ces protéases sont majoritairement présentes au sein de la cellule sous forme de pro-caspases, zymogènes catalytiquement peu actifs, voire inactifs. Les pro-caspases possèdent une masse moléculaire de 32 à 55 kDa. Elles sont composées de 3 domaines différents : (i) un pro-domaine N-terminal, de 3 à 24 kDa, (ii) un domaine central de 17 à 20 kDa, qui comporte le site catalytique, appelé grande sous-unité p20, et (iii) un domaine C-terminal, de 10 à 12 kDa, la petite sous unité p10. Les sous-unités

p20 et p10, qui participent toutes les deux à la reconnaissance des résidus P1-P4, sont séparées par une séquence « linker ». Les caspases peuvent également être distinguées selon la longueur de leur pro-domaine. Les pro-caspases des groupes I et II ont un pro-domaine N-terminal long, de plus de 90 acides aminés, par opposition aux caspases du groupe III dont le pro-domaine N-terminal est court (20-30 acides aminés). Le pro-domaine N-terminal correspond à deux domaines effecteurs de mort en tandem (DED, pour Death Effector Domain), pour les pro-caspases 8 et 10, et à un domaine CARD (pour Caspase Recruitment Domain) pour les pro-caspases 1, 2, 4, 5, 9, 11 et 12. Ces pro-domaines permettent les interactions homotypiques des pro-caspases au sein de complexes de signalisation induisant la mort, dans le cas des caspases du groupe II, ou l'inflammation dans le cas des caspases du groupe I.

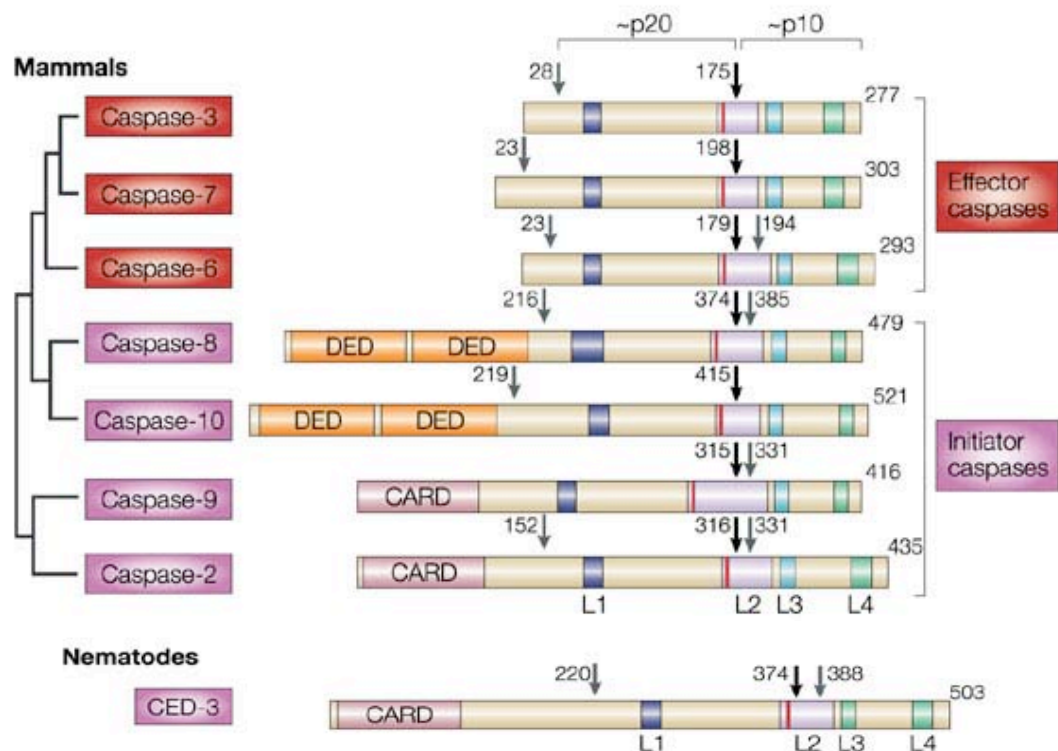


Figure 3 Structure et classification des caspases de l'apoptose. Les caspases effectrices (du groupe III) (en rouge) possèdent un prodomaine court contrairement aux initiateuses (du groupe II) (en mauve). Les caspases initiateuses (du groupe I) possèdent deux domaines DED en tandem (caspases 8 et 10) ou un domaine CARD (caspases 2 et 9). Les flèches noires indiquent le premier site de clivage entre les domaines p10 et p20 et les flèches grises constituent des sites additionnels de clivage. La cystéine catalytique est représentée par un trait rouge. CED3, la première caspase identifiée chez *C. Elegans* est la seule nécessaire pour l'apoptose. Elle contient un domaine CARD et joue le rôle à la fois de caspase initiateuse et effectrice (Riedl & Shi, 2004).

En l'absence de stimuli apoptotique, les pro-caspases initiateuses sont présentes dans la cellule sous forme de monomères comportant une grande et une petite sous-unité (Boatright *et al.*, 2003) qui possèdent une activité faible mais détectable (Muzio *et al.*, 1998). Plusieurs

modèles d'activation des pro-caspases initiatrices ont été proposés mais quel que soit le modèle considéré, leur activation nécessiterait le recrutement et l'association de plusieurs monomères au sein de complexes protéiques de signalisation. A l'inverse, en l'absence de stimulation, les caspases effectrices sont présentes dans la cellule sous forme de dimères inactifs. Leur activation nécessite leur clivage par les caspases initiatrices, ce qui constitue une cascade d'activation des caspases.

1.2.3. La voie extrinsèque ou dépendante des récepteurs de mort.

Comme mentionné précédemment, l'apoptose peut être induite par l'activation des récepteurs de mort, voie de signalisation apoptotique que l'on qualifie alors d'extrinsèque.

1.2.3.1. Structure et rôles physiologiques des ligands et des récepteurs de mort.

1.2.3.1.1. Présentation de la famille des récepteurs de mort et de leurs ligands.

Les récepteurs de mort (DR pour Death Receptors) sont, pour la plupart, des protéines transmembranaires de type I, membres de la famille du TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor). Les membres de cette famille présentent un domaine extracellulaire relativement conservé. En effet, ces récepteurs, qui ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque, ont plusieurs domaines riches en cystéines (CRD, pour Cystein Rich Domains) du côté extracellulaire N-terminal, ce qui leur confère l'appartenance à la même famille (Figure 4). Les DR sont caractérisés par la présence d'un domaine de 60 à 80 acides aminés du côté intracellulaire C-terminal, le Death Domain (DD) ou domaine de mort (Itoh & Nagata, 1993 ; Tartaglia *et al.*, 1993), qui permet le recrutement homotypique de protéines adaptatrices telles que FADD (pour Fas-Associated Death Domain protein), DAXX (Death Domain associated protein) ou TRADD (TNFR1-Associated Death Domain protein) et la transmission du signal apoptotique. Ces différents récepteurs sont généralement activés suite à leur liaison avec leurs ligands respectifs sur leur domaine LBD (Ligand Binding Domain). Dans certaines circonstances, en particulier en réponse à certaines chimiothérapies, une activation ligand-indépendante a toutefois été observée.

Huit DR sont actuellement connus : TNFR-1, CD95, TRAMP, TRAIL-R1 (pour TNF-related apoptosis-inducing ligand Receptor 1), TRAIL-R2, DR6, EDAR (pour Ectodermal Dysplasia Receptor) et p75-NGFR (pour Nerve Growth Factor Receptor) (Figure 4) (Tableau 1). Il existe une seconde classe de récepteur, appelés récepteurs leurres, ou DcR (pour Decoy

Receptor), capables de lier certains ligands de mort sans déclenchement d'une signalisation apoptotique étant donné qu'ils ne contiennent pas de domaine de mort. Quatre récepteurs leurres sont connus actuellement : DcR1, DcR2, DcR3 et OPG (pour ostéoprotégérine) (Figure 4) (Tableau 1).

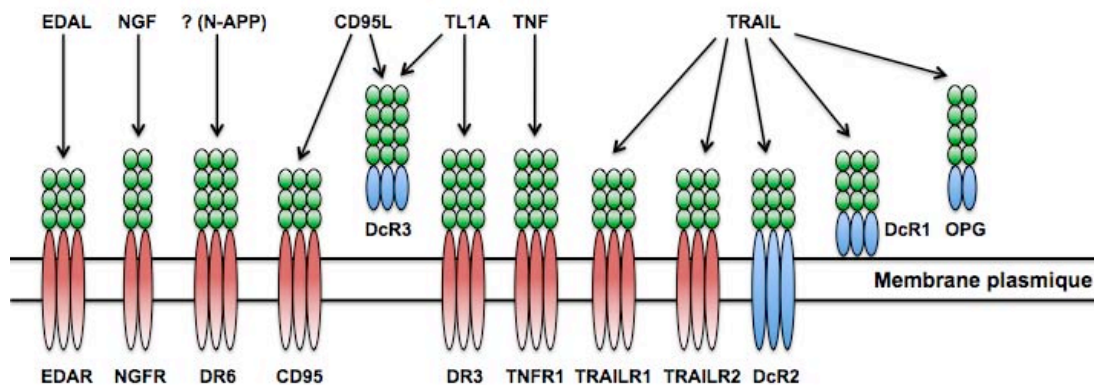


Figure 4 : Structure globale des différents DR et DcR. Huit récepteurs de mort sont connus (TNFR1, CD95, DR3, TRAILR1, TRAILR2, DR6, EDAR et NGFR) et 4 récepteurs leurres (DcR1, DcR2, DcR3 et OPG). En vert, les domaines riches en cystéine. DR6 reste le récepteur le moins étudié à ce jour et on ne connaît pas son ligand physiologique. DR6 jouerait un rôle dans la neurodégénérescence au cours de la maladie d'Alzheimer. En effet, la liaison d'un fragment extracellulaire d'un précurseur de la protéine β -amyloïde (N_APP) à DR6 conduirait à une mort neuronale via l'activation de la caspase 6 au cours de cette maladie (Nikolaev et al. 2009).

| Récepteurs : nom usuel | Récepteurs : autres noms | Ligand (s) : nom usuel | Ligand(s) : autres noms |
|------------------------|-----------------------------------|------------------------|----------------------------|
| TNFR1 | DR1/p55/p60/CD120a/TNFRSF1A | TNF-alpha | TNFSF2 |
| CD95 | DR2/APO-1/Fas/TNFRSF6 | CD95L | FasL/TNFSF6/CD178 |
| TRAMP | DR3/APO-3/WSL-1/LARD | TL1A | APO3L |
| TRAIL-R1 | DR4/APO-2/TNFRSF10A | TRAIL | APO2L/TNFSF10 |
| TRAIL-R2 | DR5/APO-2/KILLER/TRICK2/TNFRSF10B | TRAIL | APO2L/TNFSF10 |
| DR6 | TR7/TNFRSF21 | ? (N-APP) | |
| EDAR | | EDAL | |
| p75-NGFR | | NGF | |
| DcR1 | TRAIL-R3/TRID/TNFRSF10C/LIT | TRAIL | APO2L/TNFSF10 |
| DcR2 | TRAIL-R4/TNFRSF10D/TRUNDD | TRAIL | APO2L/TNFSF10 |
| DcR3 | TR6 | CD95L et TL1A | FasL/TNFSF6/CD178 et APO3L |
| OPG | TNFRSF11B | TRAIL | APO2L/TNFSF10 |

Table 1 : Nomenclature des récepteurs de mort, des récepteurs leurres et de leurs ligands respectifs. 10

Avant toute liaison, les DR sont déjà pré-assemblés en complexes dimériques voire trimériques, *via* leur domaine PLAD (pour Pre-Ligand Assembly Domain), situé au niveau extracellulaire (Chan *et al.*, 2000). Les récepteurs, ainsi pré-assemblés ne sont toutefois pas activés et doivent donc lier leurs ligands, généralement trimériques, pour transmettre le signal apoptotique. Les ligands de mort sont des cytokines de la famille du TNF, protéines transmembranaires de type II ou solubles après clivage par des métalloprotéases. Les ligands de mort les plus étudiés sont le TNF-alpha, TRAIL et CD95L qui lient respectivement les récepteurs TNFR1, DR4/DR5/DcR1/DcR2/OPG et CD95/DcR3.

Le TNF (pour Tumor Necrosis Factor ou facteur nécrosant des tumeurs) fut le premier ligand de mort découvert au sein de cette famille. Il se lie à deux récepteurs, le TNFR1 et le TNFR2, mais seul le TNFR1 possède un DD. Toutefois, la liaison du TNF sur le TNFR1 n'induit pas nécessairement la mort de la cellule, la plupart du temps au contraire, elle induit des voies de signalisation en faveur de la survie cellulaire. Le TNFR1 a ainsi été impliqué dans la différenciation et la prolifération cellulaire ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires, *via* l'expression de gènes dépendant notamment du facteur de transcription NFκB. Ainsi, expérimentalement il est souvent nécessaire, d'associer au TNF un inhibiteur de la transcription ou de la traduction pour induire la mort, contrecarrée par les voies de survie également activées. Certains des gènes dont l'expression est activée par NFκB sont en effet anti-apoptotiques. Chez la souris, le déficit en TNF ne s'accompagne pas d'altération de l'homéostasie tissulaire suggérant un rôle mineur de cette cytokine dans la mort cellulaire. Les souris TNFKO sont susceptibles aux infections bactériennes, illustrant le rôle majeur de cette cytokine dans les réponses immuno-inflammatoires anti-microbiennes. Chez l'Homme, le TNF alpha joue un rôle majeur dans le développement de certaines maladies autoimmunes, telle que la polyarthrite rhumatoïde, et dans la réponse immunitaire anti-infectieuse.

1.2.3.1.2. CD95 et CD95L.

1.2.3.1.2.1. Structure du récepteur.

Le récepteur CD95 (Fas ou APO-1), glycoprotéine transmembranaire de 335 acides aminés et 45 kDa, a été découvert en 1989 comme cible d'IgM ou d'IgG3 induisant l'apoptose de cellules lymphocytaires cancéreuses, ou non, *in vitro* et *in vivo* (Trauth *et al.*, 1989 ; Yonehara *et al.*, 1989). Le gène codant pour ce récepteur fut cloné deux ans après (Itoh *et al.*, 1991). Les récepteurs CD95 sont constitutivement pré associés sous forme de trimères à

la surface cellulaire *via* leur domaine PLAD (Papoff *et al.*, 1999 ; Chan *et al.*, 2000). Cette pré-association est nécessaire à l'induction du signal apoptotique par CD95L (Siegel, 2000), dont la liaison induirait une agrégation massive de plusieurs de ces trimères (Muppidi & Siegel, 2004). CD95 présente 3 domaines extracellulaires CRD. CRD1 constitue une partie du domaine PLAD et CRD 2 et 3 constituent le LBD (pour Ligand Binding Domain), c'est-à-dire le domaine de liaison au ligand CD95L (Figure 5). Dans sa partie intracellulaire C-terminale (Figure 5), CD95 contient un domaine de mort qui est indispensable pour le recrutement de la protéine adaptatrice FADD et l'induction d'apoptose après interaction avec son ligand ou des anticorps agonistes (Itoh & Nagata, 1993).

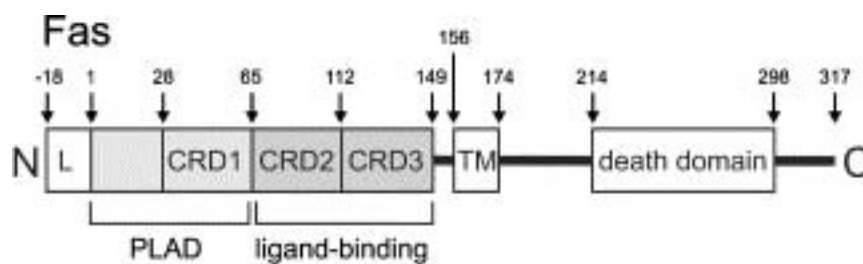


Figure 5 : Structure du récepteur Fas. Le récepteur Fas est une protéine transmembranaire de type I, avec l'extrémité N-terminale extracellulaire et l'extrémité C-terminale cytoplasmique. L : séquence signal (clivée au cours de la traduction), CRD : Cystein Rich Domain, PLAD : Pre-Ligand Association Domain, TM : TransMembrane domain, Ligand-Binding : domaine de liaison au ligand, Death domain : domaine de mort (Wajant, Pfizenmaier, et Scheurich 2003).

I.2.3.1.2.2. Structure de CD95L/FasL.

Le gène codant pour CD95L (ou FasL), une glycoprotéine transmembranaire de type II de 40 kDa appartenant à la famille du TNF, fut identifié en 1993 (Suda *et al.*, 1993). La partie extracellulaire de CD95L présente de fortes homologies avec les parties extracellulaires des autres ligands de la famille du TNF. En plus de sa forme membranaire, CD95L peut également être retrouvé sous forme soluble après clivage par des métalloprotéases (Kayagaki *et al.*, 1995) telles que MMP-3 (Matsuno *et al.*, 2001), MMP-7 (Mitsiades *et al.*, 2001) et ADAM10 (Schulte *et al.*, 2007). CD95L soluble a ainsi été détecté au niveau sérique en condition pathologique, en particulier chez des patients souffrant de leucémies ou de lymphomes (Tanaka *et al.*, 1996). La forme soluble de CD95L est trimérique, grâce à l'existence d'un domaine de trimérisation présent dans la partie extracellulaire C-terminale (Figure 6) (Tanaka *et al.*, 1995).

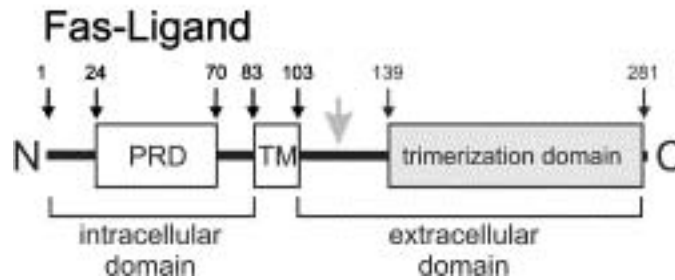


Figure 6 : Structure de Fas Ligand. FasL possède un domaine riche en proline (PRD, pour Proline Rich Domain) en intracellulaire et un domaine de trimérisation en extracellulaire. La flèche en gris désigne le site de clivage potentiel par les métalloprotéases. TM : domaine transmembranaire (Wajant, Pfizenmaier et Scheurich 2003).

I.2.3.2.2.3. Expression de CD95 et CD95L et principaux rôles physiologiques du système CD95/CD95L.

L'expression de CD95 est ubiquitaire. Elle est particulièrement élevée dans les lymphocytes T et peut être augmentée au niveau transcriptionnel, par exemple en réponse à certaines cytokines comme l'interféron- γ ou le TNF- α ou au cours de l'activation lymphocytaire (Klas *et al.*, 1993). Elle est également augmentée dans les lymphocytes infectés par certains virus tel que l'EBV (virus d'Epstein-Barr), celui de l'hépatite C ou le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (Baumler *et al.*, 1996). L'expression de CD95L est plus restreinte que celle de son récepteur puisqu'on le retrouve principalement exprimé par les cellules tueuses NK (Natural Killer) et les lymphocytes T activés. Son expression est essentiellement régulée au niveau transcriptionnel. Elle est augmentée par l'infection par certains virus dont le VIH (Westendorp *et al.*, 1995). Cette augmentation d'expression de CD95 et CD95L pourrait jouer un rôle dans le phénomène de déplétion des lymphocytes T observé au cours du SIDA (Syndrome D'Immuno Déficience Acquise). Une augmentation de l'expression de CD95L a également été mise en évidence en réponse à certains traitements de chimiothérapie, tels que l'étoposide, la doxorubicine, ou le 5-Fluorouracile, ou aux UV, par élévation de la transcription de CD95L (Kasibhatla *et al.*, 1998). Certains groupes ont d'ailleurs proposé que l'action de certaines chimiothérapies pouvait être en partie liée à une mise en jeu de la signalisation émanant de CD95, phénomène toutefois type-cellulaire dépendant (Friesen *et al.*, 1996 ; Fulda, 2004). Par ailleurs, une partie de la signalisation cytotoxique des LDL oxydées implique le système CD95/CD95L (Alcouffe *et al.*, 2004). Tout comme le couple perforine et granzyme B, deux autres molécules effectrices des lymphocytes T inductrices d'apoptose, certains auteurs ont mis en évidence que CD95L serait également présent au sein des granules des lymphocytes T et sa présence à la surface

cellulaire pourrait donc aussi être régulée par exocytose (Bossi & Griffiths, 1999). Le stockage de CD95L dans les vésicules sécrétoires serait favorisé par la présence du PRD en C-terminal (Blott *et al.*, 2001).

Bien qu'il a également été impliqué de façon plus récente dans des phénomènes de prolifération et de différenciation (Peter *et al.*, 2007), la plupart des phénomènes physiologiques décrits ci-après mettant en jeu le système CD95-CD95L reposent sur la capacité de CD95L à induire l'apoptose de cellules sensibles. Le récepteur CD95 fut en effet découvert comme cible d'IgM ou d'IgG3 induisant l'apoptose de cellules lymphocytaires cancéreuses ou non, *in vitro* et *in vivo* (Trauth *et al.*, 1989 ; Yonehara *et al.*, 1989 ; Debatin *et al.*, 1990). L'induction d'apoptose par CD95L a ensuite été largement décrite comme étant un des mécanismes effecteurs, avec l'action du couple perforine-granzyme, de la cytotoxicité médiée par les lymphocytes T et les cellules NK (Kojima *et al.*, 1994 ; Lowin *et al.*, 1994 ; Stalder *et al.*, 1994 ; Ju *et al.*, 1994 ; Hanabuchi *et al.*, 1994 ; Kagi *et al.*, 1994 ; Arase *et al.*, 1995). Il a ainsi été impliqué dans plusieurs phénomènes *in vivo* tels que la maladie du greffon contre l'hôte ou la destruction hépatique au cours des hépatites (Lin *et al.*, 1998 ; Kondo *et al.*, 1997).

CD95L est exprimé dans certains tissus particuliers, tel que l'œil ou les testicules, ce qui participerait à leur conférer un privilège immun (Green & Ferguson, 2001) en leur permettant d'éliminer les cellules immunitaires exprimant CD95. CD95L est également exprimé par certaines cellules tumorales, comme des cellules de mélanome (Hahne *et al.*, 1996) ou de cancers coliques (Ryan *et al.*, 2005) ce qui pourrait participer à un phénomène de contre-attaque tumorale par élimination des lymphocytes infiltrants la tumeur (Bennett *et al.*, 1998). L'existence de ce dernier mécanisme a toutefois été controversé par plusieurs études (Restifo, 2000).

Le système CD95/CD95L est également impliqué dans l'homéostasie hépatocytaire. Ceci a notamment été suspecté suite à l'observation selon laquelle l'injection intra-péritonéale d'un anticorps anti-CD95 agoniste Jo2 (Ogasawara *et al.*, 1993) ou de CD95L (Huang *et al.*, 1999) induit une apoptose massive des hépatocytes conduisant à la mort de souris sauvages. A l'inverse, cet effet n'est pas observé chez des souris n'exprimant pas CD95 (souris *lpr/lpr* pour lymphoprolifération) ou exprimant un CD95 non fonctionnel car présentant une mutation ponctuelle au niveau du DD qui l'empêche de recruter la protéine adaptatrice FADD

(souris *lpr^{cg}/lpr^{cg}*) (Ogasawara *et al.*, 1993). Un groupe a généré des souris KO (Knock-Out) pour CD95. Ces souris, complètement déficientes en CD95, présentent une hyperprolifération lymphocytaire et une splénomégalie mais également une hyperplasie hépatique, avec une augmentation de la taille des noyaux des hépatocytes, renforçant l'idée selon laquelle le système CD95/CD95L est impliqué dans l'homéostasie hépatique (Adachi *et al.*, 1995).

L'importance du système CD95/CD95L dans l'homéostasie lymphocytaire fut mise en évidence *via* l'observation de phénotypes murins et humains particuliers associés à des mutations de CD95 ou de son ligand. En effet, les souris *lpr/lpr* et *lpr^{cg}/lpr^{cg}*, développent des lymphadénopathies et un syndrome ressemblant au lupus érythémateux disséminé (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992). Une caractéristique remarquable chez ces animaux est la présence d'une accumulation anormale de lymphocytes T CD4-CD8- en périphérie. Ce type d'observation a également été réalisée chez des souris CD95 KO (Adachi *et al.*, 1996). De même, les souris *gld/gld* (pour generalized lymphoproliferative disease), qui portent une mutation ponctuelle homozygote dans la région C-terminale de CD95L, suffisante à altérer sa liaison avec le récepteur CD95, et donc sa fonction pro-apoptotique, souffrent de lymphadénopathies (Takahashi *et al.*, 1994). Enfin, la réexpression de CD95 spécifiquement dans les lymphocytes T de souris *lpr/lpr* permet d'empêcher l'apparition du syndrome lymphoprolifératif ce qui suggère fortement que le système CD95/CD95L est impliqué dans l'homéostasie des lymphocytes T (Wu *et al.*, 1994). Chez l'Homme, des mutations germinales et somatiques dans le gène codant pour CD95, CD95L ou des protéines impliquées dans la signalisation pro-apoptotique sous-jacente ont été associées avec le développement de certains syndromes lymphoprolifératifs auto-immuns (ALPS) (Fisher *et al.*, 1995 ; Rieux-Laucat *et al.*, 1995). Cette maladie, qui concerne environ 500 patients dans le monde, est un défaut d'origine génétique de l'apoptose lymphocytaire qui résulte en particulier en une accumulation de lymphocytes T double négatifs CD4- CD8- circulants (au moins 1,5 % des lymphocytes totaux), une lymphadénopathie chronique et/ou une splénomégalie, ces deux critères principaux étant requis pour l'établissement du diagnostic d'ALPS (Oliveira *et al.*, 2010). Les différents symptômes observés au cours des ALPS seraient en partie liés à l'incapacité des lymphocytes activés à mourir, par absence d'un système CD95/CD95L fonctionnel. En effet, le système CD95/CD95L est non seulement un système effecteur de la toxicité des lymphocytes T mais est aussi impliqué dans l'AICD (Activation-Induced Cell Death) en périphérie (Ju *et al.*, 1995 ; Alderson *et al.*, 1995), une

mort cellulaire par apoptose des lymphocytes T matures et activés en fin de réponse immunitaire.

Plusieurs types d'ALPS ont été décrits, définis selon le type de mutation génétique sous-jacente et la sensibilité des lymphocytes du patient à l'apoptose médiée par CD95 (Tableau 2). Un de ces deux critères accessoires, en plus des deux critères principaux cités ci-dessus, doit être rempli pour établir le diagnostic d'ALPS (Oliveira *et al.*, 2010). Les patients présentant des mutations germinales homozygotes ou hétérozygotes de CD95 (anciens ALPS de type 0 ou Ia) sont maintenant désignés comme souffrant d'un ALPS-FAS (Tableau 2). Ce type de mutation se traduit soit par l'absence de récepteur CD95 (ALPS de type 0), soit par l'expression de récepteurs mutés (ALPS de type Ia), la plupart du temps au niveau du DD. Ces récepteurs mutés agiraient comme des dominants négatifs vis-à-vis des récepteurs non mutés. Toutefois, la pénétrance clinique est variable étant donné que certains membres de la famille de patients atteints d'ALPS-FAS présentent les mêmes défauts d'apoptose et les mêmes mutations génétiques, sans que cela se traduise par un quelconque symptôme. Récemment, une étude a permis de mettre en évidence que certains patients possèdent une mutation germinale sur un premier allèle de CD95, associée soit à une seconde mutation somatique sur le second allèle, soit à une perte d'hétérozygotie (Magerus-Chatinet *et al.*, 2011). Les patients souffrant d'un ALPS-sFAS présentent des mutations somatiques du récepteur CD95 tandis que ceux qui présentent des mutations germinales du ligand ou de la caspase-10 appartiennent respectivement aux groupes ALPS-FASLG et ALPS-CASP10. Ceux qui souffrent d'ALPS d'origine génétique inconnue appartiennent au groupe ALPS-U (pour Undetermined). Enfin, un nouveau groupe de maladies apparentées aux ALPS a été créé et regroupe notamment les patients présentant des mutations du gène codant pour la caspase 8. Les patients souffrant d'ALPS-FAS représentent environ 70% des cas d'ALPS, suivis des ALPS-sFAS, puis des ALPS-CASP10 et des ALPS-FASLG.

| Ancienne nomenclature | Nouvelle nomenclature | Gene | Définition |
|-----------------------------------|-----------------------|---------------|---|
| ALPS de type 0 et ALPS de type Ia | ALPS-FAS | <i>FAS</i> | Les patients remplissent les critères de diagnostic d'ALPS et ont des mutations germinales homozygotes de <i>FAS</i> . |
| ALPS de type Im | ALPS-sFAS | <i>FAS</i> | Les patients remplissent les critères de diagnostic d'ALPS et ont des mutations somatiques de <i>FAS</i> . |
| ALPS de type Ib | ALPS-FASLG | <i>FASLG</i> | Les patients remplissent les critères de diagnostic d'ALPS et ont des mutations germinales de <i>FASLG</i> . |
| ALPS de type IIa | ALPS-CASP10 | <i>CASP10</i> | Les patients remplissent les critères de diagnostic d'ALPS et ont des mutations germinales de <i>CASP10</i> . |
| ALPS de type III | ALPS-U | Non déterminé | Les patients remplissent les critères de diagnostic d'ALPS mais aucune mutation génétique n'est détectée (pour <i>FAS</i> , <i>FASLG</i> , <i>CASP10</i>). |

Table 2. Nouvelle classification des ALPS d'après (Oliveira et al. 2010).

Les patients souffrant d'ALPS ont un risque accru de développer des lymphomes (Straus *et al.*, 2001), suggérant également un rôle important du système CD95/CD95L dans l'immunité anti-tumorale, au moins dans les tissus lymphoïdes. De plus, des mutations du récepteur CD95, essentiellement situées au niveau du DD, ont été retrouvées dans différents types de cancers (Peter *et al.*, 2005). Il a ainsi été proposé que le système CD95/CD95L pouvait être impliqué dans l'immunité anti-tumorale *via* son rôle de mécanisme effecteur des lymphocytes cytotoxiques. Plusieurs études ont mis en évidence *in vitro* que des lymphocytes T activés qui expriment la forme membranaire de CD95L peuvent induire l'apoptose de cellules CD95 positives, notamment tumorales. Cet effet cytotoxique, étant inhibé par l'utilisation d'anticorps ou de protéines de fusion Fas-Fc neutralisants CD95L, est bel et bien médié par CD95 (Rouvier *et al.*, 1993). *In vivo*, chez des souris immunodéficientes, l'injection intra-péritonéale d'anticorps agonistes anti-CD95 humain permet une régression tumorale transitoire de cellules SKW6.4, des lymphocytes humains B transformés par EBV, implantées en sous-cutané (Trauth *et al.*, 1989). Dans certains cas, il a été mis en évidence que l'injection *in vivo* de cellules tumorales permettait d'augmenter leur expression de CD95 de façon très précoce, ce qui pourrait permettre leur élimination par les lymphocytes exprimant CD95L (Rosen *et al.*, 2000). De plus, l'expression de CD95 par les cellules tumorales pourrait être stimulée par les cellules NK elles-mêmes ce qui permettrait une diminution de la progression tumorale *via* l'action cytotoxique de ces cellules NK (Bradley *et al.*, 1998 ; Screpanti *et al.*, 2001). Chez le patient, il a été mis en évidence que les lymphocytes CD8+ infiltrants des carcinomes du rein présentaient une expression exacerbée de CD95L, suggérant sa potentielle implication dans la réponse immune anti-tumorale (Elsässer-Beile *et al.*, 2003).

Expérimentalement, des différences de fonction et de signalisation ont été observées entre CD95L, sous sa forme soluble et membranaire, et des anticorps anti-CD95 agonistes, selon le contexte et le type cellulaire. Ainsi, ni CD95L soluble ni un anticorps monoclonal anti-CD95 n'induisent l'apoptose de lymphocytes du sang périphérique non activés, tandis qu'ils sont sensibles à l'utilisation de CD95L membranaire (Suda *et al.*, 1997). CD95L soluble, tout comme l'anticorps monoclonal anti-CD95 CH-11 de type IgM utilisé dans cette étude, semble même exercer un effet inhibiteur sur la mort induite par CD95L membranaire dans les lymphocytes du sang périphérique non activés. L'activation de ces lymphocytes permet toutefois de les sensibiliser vis-à-vis de CD95L soluble (Suda *et al.*, 1997). Les auteurs proposèrent ainsi que le clivage de CD95L exercerait plutôt un effet inhibiteur vis-à-vis de son activité cytotoxique pour éviter l'élimination de cellules pouvant encore être utiles à l'organisme (lymphocytes naïfs ou au repos). Le même type d'observation a été réalisée par l'équipe de Nagata sur des cellules Jurkat, une lignée de leucémie T humaine, et des hépatocytes (Tanaka *et al.*, 1998). Alors que l'injection de cellules de lymphomes exprimant uniquement CD95L membranaire induit un recrutement de neutrophiles, ceci n'est pas observé pour des cellules exprimant uniquement la forme soluble de ce ligand (Hohlbaum *et al.*, 2000). La même étude a mis en évidence que les cellules exprimant uniquement CD95L soluble, contrairement à celles exprimant la forme membranaire, peuvent former des tumeurs chez la souris (Hohlbaum *et al.*, 2000). De plus, la co-injection des deux populations cellulaires permet aux cellules exprimant CD95L membranaire de former des tumeurs. Les auteurs ont ainsi suggéré que CD95L soluble, par son absence d'action pro-inflammatoire aiguë et apoptotique, pourrait avoir un effet pro-tumorigène et contrecarrer l'effet de CD95L sous forme membranaire. Les différences d'action observées entre CD95L soluble, CD95L membranaire et les différents types d'anticorps agonistes pourraient également en partie s'expliquer par des différences de degré d'oligomérisation de CD95 que ces différents agonistes sont capables d'induire. En effet, alors que l'injection d'anticorps anti-CD95 agonistes induit une hépatotoxicité massive et létale chez la souris (Ogasawara *et al.*, 1993), une étude montra plus tard que ce n'est pas le cas quand du CD95L soluble recombinant est utilisé, et qu'une oligomérisation de CD95L soluble à l'aide d'anticorps est nécessaire pour rendre ce CD95L hépatotoxique (Schneider *et al.*, 1998). Certains auteurs ont ainsi proposé que la cytotoxicité induite par CD95L, sous sa forme soluble, nécessitait son oligomérisation au minimum sous forme d'hexamère, c'est-à-dire un regroupement de deux trimères de récepteurs (Holler *et al.*, 2003). De plus, seuls certains isotypes d'anticorps anti-CD95 induisent l'apoptose de cellules exprimant CD95, ces observations étant attribuées à des

différences naturelles d'oligomérisation des différents isotypes, et donc à l'induction d'un degré différent d'oligomérisation de l'antigène cible (Dhein *et al.*, 1992 ; Trauth *et al.*, 1989). L'utilisation d'anticorps agonistes de CD95 pourrait induire des événements de signalisation différents de ceux observés avec CD95L soluble ou membranaire (Huang *et al.*, 1999). Ainsi, alors que l'utilisation d'anticorps anti-CD95 agonistes résulte en une formation de macrocomplexes de récepteurs CD95 de 200-250 kDa résistants aux agents dénaturants, ceci n'est pas observé en réponse à CD95L soluble ou membranaire (Legembre *et al.*, 2003) (cf. chapitre I.2.3.2.2). De plus, la réponse aux différentes formes de CD95L serait largement type-cellulaire dépendante et serait différente selon l'appartenance aux groupes de cellules dites de type I ou de type II (cf. chapitre I.2.6). Enfin, une étude récente utilisant des modèles murins ne pouvant produire CD95L sous sa forme soluble ou, à l'inverse, ne pouvant exprimer CD95L sous sa forme membranaire, a mis en évidence que seule la forme membranaire de CD95L semble essentielle pour sa fonction cytotoxique, anti-tumorigène et de prévention des lymphadénopathies et de l'autoimmunité tandis que la forme soluble aurait plutôt un effet favorisant l'auto-immunité et la tumorigénèse (O' Reilly *et al.*, 2009).

1.2.3.1.3. DcR3.

Un troisième récepteur pour CD95L a été décrit, il s'agit d'un récepteur leurre nommé DcR3 (Decoy Receptor 3). Ce récepteur ne possédant pas de domaine transmembranaire est soluble. DcR3 est surexprimé par certaines cellules cancéreuses primaires de poumon et de colon (Pitti *et al.*, 1998). Il rentrerait alors en compétition avec CD95 pour la liaison de CD95L et bloquerait ainsi l'apoptose induite par CD95L. La surexpression de DcR3 par les cellules tumorales pourrait ainsi être un moyen efficace d'échappement au système immunitaire. DcR3 est également surexprimé dans des glioblastomes dans lesquels son niveau d'expression est corrélé au degré de malignité (Roth *et al.*, 2001). De plus, dans le modèle 9L de gliosarcome de rat, l'expression ectopique de DcR3 par les tumeurs réduit l'infiltration de cellules T CD4+ et CD8+ ainsi que des cellules de la microglie (Roth *et al.*, 2001). DcR3 est également capable de lier la cytokine TL1A et joue donc également le rôle de récepteur leurre en compétition avec DR3 pour la liaison de cette cytokine (Migone *et al.*, 2002).

1.2.3.1.4. TRAIL et ses récepteurs.

1.2.3.1.4.1. Structure de TRAIL et de ses récepteurs.

Le ligand TRAIL (Apo2L), de 281 acides aminés, a été identifié en 1995 par deux groupes, par homologie de séquence avec la partie extracellulaire de CD95L et du TNF (Wiley *et al.*, 1995 ; Pitti *et al.*, 1996). TRAIL est une protéine transmembranaire de type II s'associant en trimère et pouvant donc lier trois récepteurs, cette trimérisation du ligand potentialisant son activité biologique. La présence d'un atome de zinc associé à des cystéines est indispensable à son activité biologique (Hymowitz *et al.*, 1999). Plus précisément, la cystéine située en position 230 de chacun des monomères permet la formation et la stabilité de trimères de TRAIL de façon zinc-dépendante (Bodmer, 2000).

Cinq récepteurs de TRAIL furent ensuite identifiés chez l'Homme. Deux sont des récepteurs de mort classiques, DR4 et DR5, et les trois autres, DcR1, DcR2 et OPG, sont des récepteurs leurres. DR4 a d'abord été identifié par homologie de séquence avec la partie du TNFR1 contenant son domaine de mort (Pan, 1997a). DR5 a ensuite été identifié par plusieurs groupes la même année, notamment grâce à son homologie de séquence avec la partie de DR4 liant TRAIL, avec le DD du TNFR1, de CD95 et de DR3 ou encore avec les domaines CRD des membres de la famille des TNFRs (Walczak *et al.*, 1997 ; MacFarlane *et al.*, 1997 ; Screaton *et al.*, 1997). Au niveau structural, DR4 et DR5 sont des protéines transmembranaires de type I qui possèdent un DD intra-cytoplasmique ainsi que trois CRD dans leur partie extracellulaire (Figure 7). DR5 possède deux formes d'épissage alternatif, la différence fonctionnelle entre ces deux formes restant à déterminer (Wang & Jeng, 2000). DR4 et DR5 sont O-glycosylés sur plusieurs sites et la présence de ces O-glycosylations favorise l'oligomérisation précoce des récepteurs suite à la liaison de TRAIL (Wagner *et al.*, 2007). DcR1 et DcR2 ont été identifiés selon leur homologie de séquence avec la partie extracellulaire de liaison à TRAIL de DR4 et DR5 et possèdent également 3 CRD (Pan, 1997b ; MacFarlane *et al.*, 1997 ; Sheridan, 1997 ; Marsters *et al.*, 1997 ; Degli-Esposti *et al.*, 1997b ; Degli-Esposti *et al.*, 1997a). DcR1, qui ne contient pas de domaine cytoplasmique, est ancré à la membrane *via* une ancre GPI (pour Glycosyl Phosphatidyl Inositol). DcR2 possède un domaine transmembranaire et un domaine de mort tronqué qui n'est pas fonctionnel. Enfin, TRAIL lie aussi un cinquième récepteur, nommé ostéoprotégérine (OPG) qui est un récepteur soluble sur lequel se lie TRAIL avec une affinité plus faible (Simonet *et al.*, 1997 ; Emery *et al.*, 1998). OPG est un récepteur soluble à TRAIL exprimé par de nombreux tissus, qui joue le rôle de leurre, et neutralise donc le ligand. Il avait initialement été décrit comme étant un récepteur sécrété dimérique inhibant la différenciation des ostéoclastes (Simonet *et*

al., 1997). OPG serait ainsi un récepteur leurre pour RANKL (Receptor Activator of NF κ B Ligand), un autre membre de la superfamille du TNF α qui régule notamment la différenciation des ostéoclastes (Lacey *et al.*, 1998) Chez la souris, un seul récepteur de mort liant TRAIL à été identifié et DcR1 et DcR2 sont également exprimés (Wu *et al.*, 1999) (Figure 7).

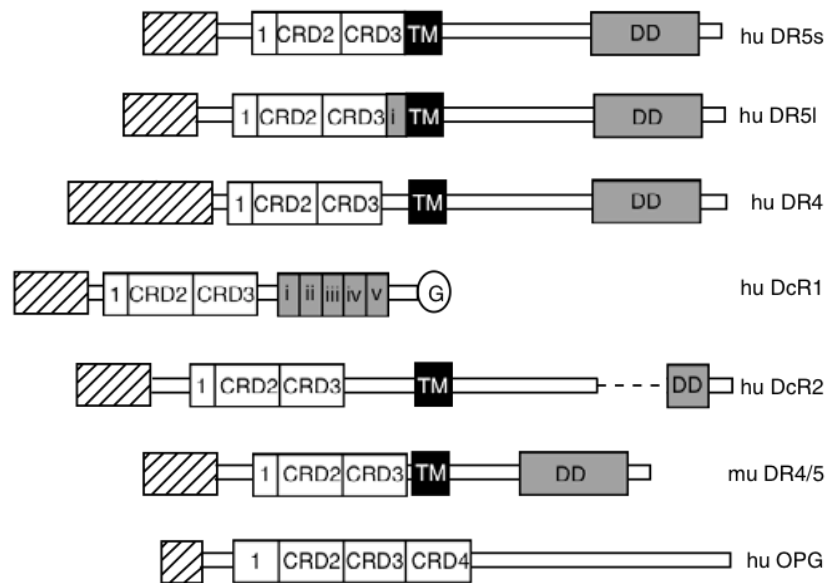


Figure 7. Structure des récepteurs liant TRAIL. Les 4 récepteurs possèdent 3 domaines riches en cystéine (CRD). TM : domaine transmembranaire, DD : domaine de mort, G : ancre GPI. Les structures numérotées de i à v sont des répétitions TAPE (riches en Thréonine Alanine Proline et Acide Glutamique) de 15 acides aminés chacune. Les structures hachurées représentent les séquences signal, clivées au cours de la traduction (LeBlanc & Ashkenazi, 2003).

I.2.3.1.4.2. Expression et rôles physiologiques de TRAIL et de ses récepteurs.

TRAIL est exprimé dans de nombreux organes et son expression est particulièrement élevée dans certains, comme la prostate, la rate et les poumons (Wiley *et al.*, 1995). De façon similaire à ce qui est connu pour CD95L, l'expression membranaire de TRAIL est augmentée au cours de l'activation lymphocytaire. TRAIL existe également sous forme soluble, suite à un clivage par des cystéines protéases. *In vitro*, l'activité cytotoxique de cette forme soluble *via* DR5 nécessiterait l'oligomérisation de ce ligand, l'oligomérisation n'étant à l'inverse pas nécessaire pour son action cytotoxique *via* DR4 (Wajant *et al.*, 2001). L'expression de TRAIL peut également être augmentée par les interférons. Il a notamment été mis en évidence qu'il pouvait être sécrété par les monocytes et les neutrophiles suite à leur stimulation par l'IFN α , leur permettant d'induire l'apoptose de cellules leucémiques *in vitro* (Tecchio *et al.*,

2004). TRAIL étant également stocké dans des vésicules sécrétoires de cellules T, son expression à la surface cellulaire peut être augmentée par exocytose (Monleón *et al.*, 2001).

DR4 et DR5 sont également exprimés par de nombreux tissus sains et cancéreux. La diminution d'expression de DR4 ou DR5 dans les cellules tumorales semble être un événement rare et qui serait donc mineur dans les phénomènes de résistance que peuvent présenter certaines cellules cancéreuses vis-à-vis de la mort induite par TRAIL. A l'inverse, de nombreuses études montrent que l'expression des récepteurs leurres est réduite dans les cellules cancéreuses (Tableau 3).

| Récepteurs | ARNm recherché dans des lignées de gliomes humaines (Monleón <i>et al.</i> , 2001) | ARNm recherché dans des lignées de mélanome (Griffith <i>et al.</i> , 1998) | ARNm détecté dans des lignées de carcinomes mammaires. (Rieger <i>et al.</i> , 1998) |
|------------|--|---|--|
| DR4 | 8/12 | 4/8 | 11/11 |
| DR5 | 11/12 | 8/8 | 11/11 |
| DcR1 | 4/12 | 1/8 | 3/11 |
| DcR2 | 2/12 | 1/8 | Non évalué |

Tableau 3. Exemple d'évaluation de l'expression des récepteurs à TRAIL dans différentes lignées cancéreuses.

Différentes voies de signalisation pourraient influencer la sensibilité cellulaire vis-à-vis de TRAIL en modulant l'expression de ses récepteurs. Au niveau transcriptionnel, l'expression de DR5 est augmentée suite à l'activation de p53 (Wu *et al.*, 1997). De plus, l'apoptose induite par TRAIL est exacerbée en présence de divers agents chimiothérapeutiques tels que l'étoposide, l'aracytidine et la doxorubicine, phénomène attribué à une augmentation de l'expression de DR5 dans des cellules leucémiques HL-60 (Wen *et al.*, 2000). Plusieurs études ont également mis en évidence une augmentation d'expression des protéines DR4 et/ou DR5 en réponse à des inhibiteurs du protéasome, tels que le Bortezomib, des inhibiteurs d'histones déacétylases, l'irradiation, le 5-Fluorouracil (5FU) et le cisplatine dans différents types de lignées cancéreuses (Koschny *et al.*, 2007 ; Guo *et al.*, 2004 ; Di Pietro *et al.*, 2001 ; Ganten *et al.*, 2004 ; Kondo *et al.*, 2006). Toutefois, plusieurs études indiquent qu'il n'existerait pas nécessairement de corrélation entre l'expression des récepteurs, que ce soit au niveau de l'ARNm ou de la protéine et la sensibilité à la mort induite par TRAIL. Par exemple, des mutations du DD de DR4 ainsi que le niveau d'expression de c-FLIP (cf. chapitre I.2.7.1) rentrent en jeu pour réguler cette sensibilité (Kim *et al.*, 2000). L'effet

synergique de l'utilisation de 5FU et de TRAIL a d'ailleurs été également attribué à la capacité du 5FU d'induire une diminution de l'expression de c-FLIP (Ganten *et al.*, 2004).

Parmi les premières expériences menées sur les récepteurs de TRAIL, il a été montré que la transfection transitoire de cellules par DR4 ou DR5 peut déclencher l'apoptose (Pan, 1997a ; Sheridan, 1997). TRAIL peut induire l'apoptose cellulaire *via* DR4 ou DR5 de façon indépendante (Kischkel *et al.*, 2000 ; Sprick *et al.*, 2000). Dans les cellules qui expriment les deux récepteurs, des hétérocomplexes DR4-DR5 peuvent être formés mais leur rôle reste indéterminé (Kischkel *et al.*, 2000).

La transfection transitoire de DcR1 dans des cellules sensibles à TRAIL n'induit pas d'apoptose en elle-même et s'oppose à l'apoptose induite par ce ligand (Sheridan, 1997). Il a également été mis en évidence que le clivage de l'ancre GPI de DcR1, par le traitement de cellules par une PI-PLC (pour Phosphatidyl Inositol-Phospholipase C) exogène s'accompagne d'une sensibilisation des cellules (Sheridan, 1997). De façon similaire, la transfection transitoire de DcR2 dans des cellules sensibles à TRAIL n'a pas d'effet cytotoxique intrinsèque et inhibe l'apoptose induite par ce ligand, effet qui ne dépendrait pas de la présence du domaine cytoplasmique de ce récepteur (Sheridan, 1997). Il a initialement été proposé que l'action inhibitrice des récepteurs leurres sur la signalisation cytotoxique induite par TRAIL était due à une compétition de ces récepteurs avec DR4 et DR5 pour la liaison de TRAIL. Il a également été mis en évidence que l'effet inhibiteur de DcR2 serait lié à sa capacité d'interaction avec DR5 *via* le domaine PLAD (Clancy *et al.*, 2005). De plus, le groupe d'Olivier Micheau a mis en évidence que DcR1 jouerait un rôle inhibiteur sur la signalisation de DR4 et DR5 en séquestrant TRAIL au sein des radeaux lipidiques. A l'inverse, DcR2 interagirait avec DR5 et inhiberait le recrutement de DR4, conduisant à la formation d'un DISC inactif (Merino *et al.*, 2006). Un autre mécanisme possible d'inhibition de la signalisation des récepteurs agonistes pourrait être lié à la capacité de TRAILR4 d'activer NFκB, qui favorise l'expression de gènes anti-apoptotiques, ou par la capacité de TRAIL à activer Akt (Lalaoui *et al.*, 2011) et à ainsi induire des signaux en faveur de la prolifération cellulaire (Degli-Esposti *et al.*, 1997a). La plupart des rôles physiologiques décrits pour TRAIL mettraient en jeu sa capacité à induire l'apoptose de cellules sensibles.

Les souris KO pour DR4, DR5 ou TRAIL ne présentent pas de défaut de développement embryonnaire, suggérant que le système TRAIL/TRAILR n'est pas essentiel à l'apoptose ayant lieu au cours de l'embryogénèse. Il a été proposé que TRAIL, dans une moindre mesure par rapport à CD95L, pourrait être impliqué dans l'AICD (Martínez-Lorenzo *et al.*, 1998). Un groupe a mis en évidence que les souris déficientes en TRAIL présentent un nombre augmenté de thymocytes et a suggéré que TRAIL pourrait être impliqué dans la sélection négative thymique (Lamhamedi-Cherradi *et al.*, 2003). Toutefois, ces résultats ont été largement remis en cause par une seconde étude (Cretney *et al.*, 2003). TRAIL jouerait également un rôle dans le privilège immun de certains tissus, par exemple le syncytiotrophoblaste, en facilitant l'apoptose de lymphocytes activés (Phillips *et al.*, 1999).

Le rôle de TRAIL, en tant que cytokine effectrice du système immunitaire jouant un rôle dans l'immunité anti-tumorale, a été plus largement étudié. Comme évoqué précédemment, contrairement à DR4 et DR5, peu de lignées cellulaires tumorales expriment DcR1 ou DcR2. Alors que TRAIL permet de tuer efficacement divers types de lignées cellulaires tumorales, la cytotoxicité est moindre, voire nulle, sur des lignées de cellules saines, d'où l'intérêt porté à ce ligand comme thérapie anti-cancéreuse potentielle (cf. chapitre I.6) (Ashkenazi *et al.*, 1999 ; Walczak *et al.*, 1999). En 2001, il a été suggéré que TRAIL, exprimé par les cellules NK murines, limitait la dissémination hépatique de différents modèles cellulaires tumoraux injectés dans la veine porte (Takeda *et al.*, 2001). Le même groupe a mis en évidence que la neutralisation de TRAIL par un anticorps favorisait le développement de tumeurs induites par un carcinogène, et que l'effet protecteur de TRAIL était en partie médié par les NK, et dépendrait de l'IFN γ (Takeda *et al.*, 2002). De plus, le développement de tumeurs formées par l'injection de cellules murines 4T1 de carcinomes mammaires ainsi que celui de fibrosarcomes chimio-induits sont exacerbés chez les souris KO pour TRAIL (Cretney *et al.*, 2002). Plus de 25% des souris déficientes pour TRAIL âgées de 500 jours présentent des cancers lymphoïdes spontanés. En 2008, le groupe d'Henning Walczak a montré que des souris KO pour TRAILR présentaient une augmentation des métastases ganglionnaires issues de cancers épidermoïdes chimio-induits (Grosse-Wilde *et al.*, 2008). Un second groupe a également mis en évidence que la perte mono ou bi-allélique de TRAILR chez des souris développant spontanément des lymphomes accélérât l'apparition et l'évolution de cette pathologie (Finnberg *et al.*, 2008). Toutefois, une étude a mis en évidence que la perte de TRAILR n'influçait pas la formation de tumeurs intestinales chez

des souris présentant une mutation hétérozygote d'*Apc* (Adenomatous Polyposis Coli) (Yue *et al.*, 2004) laissant penser que l'influence du système TRAIL/TRAILR pourrait être dépendant du type tumoral et/ou du grade.

Plusieurs études ont mis en évidence que des lignées cellulaires cancéreuses de sein, de prostate et d'adénocarcinomes coliques expriment suffisamment d'OPG pour leur conférer une résistance vis-à-vis de la mort induite par TRAIL. OPG pourrait également être produit par des cellules stromales de la moelle osseuse de patients atteints de cancers du sein ou de la prostate (pour revue : Reid & Holen, 2009). De plus, la surexpression d'OPG par des cellules de cancer du sein favorise leur croissance *in vivo* chez la souris au niveau osseux sans toutefois que cet effet soit attribué à une inhibition de l'apoptose, suggérant plusieurs types d'action d'OPG en faveur de la croissance tumorale (Fisher *et al.*, 2006).

1.2.3.2. Signalisation apoptotique émanant des récepteurs de mort.

Dans ce chapitre, les principaux événements de la signalisation apoptotique seront essentiellement décrits pour le récepteur CD95.

1.2.3.2.1. La formation du DISC, l'activation et le rôle des caspases initiateuses 2, 8 et 10 dans la signalisation apoptotique émanant des récepteurs de mort.

Les DR sont caractérisés par la présence d'un domaine de mort (DD) permettant le recrutement de protéines adaptatrices et la transmission du signal apoptotique. Une étude de cristallographie a permis de proposer un modèle précis des mécanismes moléculaires précoces faisant suite à l'interaction de CD95L avec son récepteur. Ainsi, la liaison de CD95L sur CD95 permettrait de regrouper un nombre suffisant de récepteurs en les maintenant en conformation « ouverte », c'est-à-dire ayant le DD exposé. Ce rapprochement induit la formation d'interactions entre des domaines globulaires des différents trimères de récepteurs et le DD de CD95 serait alors disponible pour lier FADD qui stabiliserait les ponts entre récepteurs (Scott *et al.*, 2008). L'interaction entre CD95 et FADD est homotypique puisque FADD contient un DD qui lui permet d'interagir avec le DD de CD95 (Boldin *et al.*, 1995 ; Chinnaiyan *et al.*, 1995). La protéine FADD est essentielle au développement embryonnaire et à l'apoptose DR3-médiée ainsi qu'à celle induite par CD95L (Zhang *et al.*, 1998 ; Juo *et al.*, 1999 ; Yeh, 1998). En effet, FADD permet le recrutement des pro-caspases initiateuses 8 (MACH/FLICE/Mch5) et 10 (FLICE2/Mch-4), *via* une interaction homotypique entre les DED (Death Effector Domain) présents sur la partie N-terminale de ces caspases et de

FADD (Boldin *et al.*, 1996 ; Muzio *et al.*, 1996 ; Vincenz & Dixit, 1997 ; Medema *et al.*, 1997). L'ensemble forme un complexe protéique en quelques secondes, le DISC pour Death Inducing Signalling Complex, dont la formation est indispensable à l'émergence des signaux apoptotiques sous-jacents (Figure 8) (Kischkel *et al.*, 1995 ; Scaffidi *et al.*, 1998). Le DISC comprend également la protéine inhibitrice c-FLIP (Irmeler *et al.*, 1997) (cf. chapitre 1.2.7). La stimulation de DR4 ou DR5 induit également l'apoptose cellulaire *via* FADD et le DISC, également formé suite à la liaison de TRAIL sur DR4 ou DR5, dont la formation serait indispensable à l'induction d'apoptose par TRAIL (Schneider *et al.*, 1997 ; Sprick *et al.*, 2000 ; Bodmer *et al.*, 2000 ; Kischkel *et al.*, 2000).

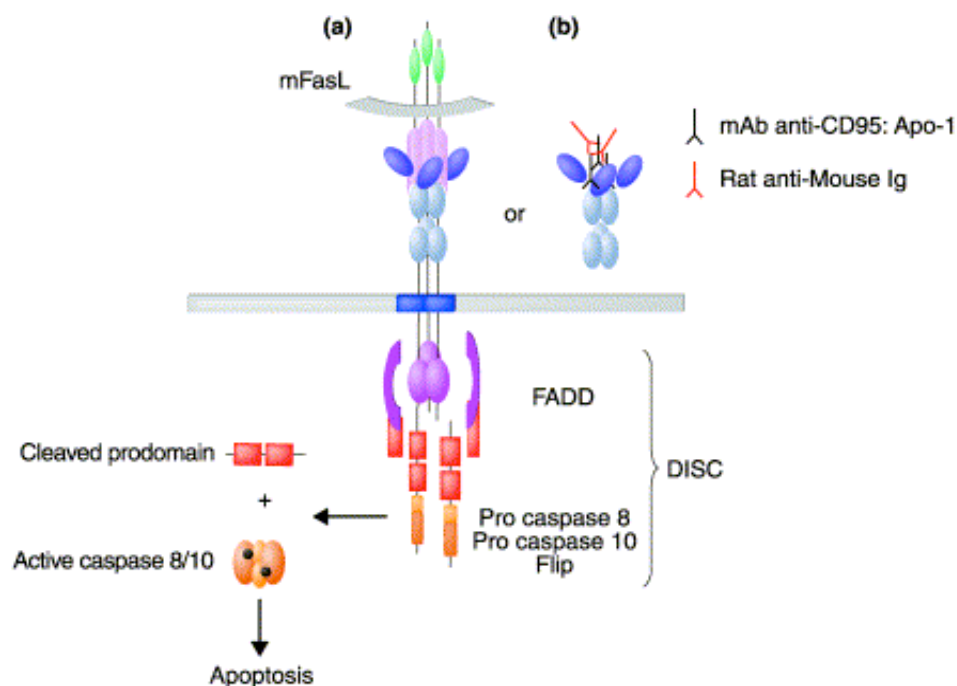


Figure 8. Formation du DISC et induction de l'apoptose. La liaison de FasL sous sa forme membranaire (mFasL) (a) ou d'un anticorps anti-Fas agoniste, oligomérisé par un anticorps secondaire, (b) induit le recrutement de FADD, la caspase 8, la caspase 10 et FLIP (cf. chapitre 1.2.7) au sein d'un complexe protéique nommé le DISC. Les caspases 8 et 10 ainsi activées peuvent alors propager le signal apoptotique (Rieux-Laucat 2003)

Les caspases 8 et 10 activées au niveau du DISC sont capables de cliver et d'activer les caspases effectrices 3, 7 et 6 qui conduiront à la protéolyse de nombreux substrats et à la mort de la cellule (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996 ; Muzio *et al.*, 1997 ; Lavrik *et al.*, 2003). L'activation des caspases 8 et 10 au sein du DISC constitue donc une étape d'initiation cruciale de la voie apoptotique extrinsèque émanant des DR. En parallèle, les caspases 8 et 10 sont également capables de cliver la protéine Bid (Bcl-2 Interacting Domain) (Milhas *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 1998) ce qui participe à l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose

(cf. chapitre I.2.4).

Selon le modèle d'activation des caspases dit de « dimérisation proximité induite », les pro-caspases initiatrices 8 peuvent s'autoactiver par clivage quand elles se trouvent regroupées en dimères, ce qui est le cas au sein du DISC (Salvesen & Dixit, 1999 ; Muzio *et al.*, 1998). Toutefois, l'importance du clivage entre les deux sous-unités dans l'activation de la pro-caspase 8 reste très controversée. Ainsi, des expériences de dimérisation *in vitro* ont permis de mettre en évidence que, bien que des mutations des sites de clivages entre les domaines p20 et p10 de la caspase 8 réduisaient l'activité catalytique des homodimères, elles ne l'abolissaient pas. Ainsi, *in vitro*, des mutants non clivables peuvent être efficacement activés par dimérisation (Chang *et al.*, 2003 ; Pop *et al.*, 2007). D'autres études ont également permis de proposer que l'activation des caspases initiatrices 8 (mais également 9) requière leur dimérisation et que leur auto-clivage protéolytique serait un événement secondaire résultant de la stabilisation de dimères actifs (Boatright *et al.*, 2003 ; Pop *et al.*, 2006 ; Donepudi *et al.*, 2003).

A l'inverse, des études suggèrent que le clivage seul, en l'absence de dimérisation, pourrait permettre l'activation de la caspase 8 (Sohn, 2004 ; Murphy, 2004). Une étude plus récente de reconstitution du DISC *in vitro* suggère qu'une forme de caspase 8 non clivable ne peut pas être efficacement activée par la formation du DISC (Hughes *et al.*, 2009). Dernièrement, une étude montre que les deux événements, dimérisation et clivage inter-domaines p10 p20, sont nécessaires à l'activation de la caspase 8 (Oberst *et al.*, 2010). D'autres événements moléculaires pourraient également influencer l'activation de la caspase 8. En effet, une étude récente a mis en évidence que la liaison de TRAIL sur ses récepteurs agonistes induit une ubiquitinylation de la caspase 8 qui favoriserait son aggrégation et son activation au sein du DISC (Jin *et al.*, 2009).

Bien qu'aucun consensus n'existe réellement quant au mode précis d'activation de la caspase 8, son rôle fonctionnel primordial dans l'induction d'apoptose par les ligands de mort CD95L ou TRAIL a été mis en évidence dans plusieurs études (Juo *et al.*, 1998 ; Salmena, 2003). Ainsi, la génération de souris déficientes en caspase 8 a permis de mettre en évidence l'importance de cette caspase dans la mort induite par les ligands de mort mais également son rôle primordial dans le développement embryonnaire en particulier du coeur, du tube neural et de progéniteurs hématopoiétiques (Varfolomeev *et al.*, 1998). La génération de souris

exprimant une caspase 8 ne pouvant être clivée a permis de mettre en évidence que ce type de mutation, contrairement à ce qui est observé chez les souris caspase 8 KO, n'est pas létale (Kang *et al.*, 2008). De plus, l'absence de clivage de la caspase 8 inhibe l'effet cytotoxique dépendant de CD95, *in vitro* et *in vivo* sans affecter les autres signalisations émanant de ce récepteur.

La caspase initiatrice 10, qui possède une homologie forte avec la caspase 8, est exprimée chez l'Homme mais pas chez la souris. Le rôle de la caspase 10, qui est également recrutée et activée au niveau du DISC, dans la signalisation apoptotique émanant des récepteurs CD95 ou TRAILs, est controversé. Ainsi, les lymphocytes de patients atteints d'ALPS-CASP10 résistent à l'apoptose induite par TRAIL ou par CD95L (Wang *et al.*, 1999). De plus, la surexpression de la caspase 10 dans des cellules Jurkat déficientes en caspase 8 permet de les resensibiliser vis-à-vis de CD95L (Wang *et al.*, 2001). Un autre groupe indique que la caspase 10, recrutée au sein du DISC sous CD95L ou TRAIL induit l'apoptose de cellules n'exprimant naturellement pas la caspase 8 (Kischkel, 2001). Toutefois, le groupe d'Henning Walczak a montré que, bien que la caspase 10 soit recrutée au sein du DISC, elle ne pouvait pas compenser fonctionnellement la déficience en caspase 8 en réponse à TRAIL ou à CD95L (Sprick *et al.*, 2002). Enfin, l'équipe de Thierry Levade a mis en évidence que le niveau d'expression de la caspase 10 endogène dans des cellules Jurkat déficientes en caspase 8, est corrélé avec leur niveau de sensibilité à CD95L (Milhas *et al.*, 2005).

La caspase initiatrice 2 est également activée en réponse à CD95L ou à des anticorps agonistes anti-CD95. Toutefois, l'importance de cette caspase dans la mort induite par les ligands de mort reste peu connue et controversée. Une étude indique que la diminution d'expression de la forme longue de la caspase 2 diminue la sensibilité des cellules vis-à-vis de la mort induite par un anticorps anti-CD95 agoniste (Droin *et al.*, 2001). Cette étude n'a toutefois pas permis de détecter la caspase 2 au sein du DISC. A l'inverse, le groupe de Peter Krammer a mis en évidence que cette caspase est recrutée et activée au sein du DISC du récepteur CD95, mais qu'elle ne peut se substituer à la caspase 8 pour l'induction d'apoptose (Lavrik *et al.*, 2006).

Faisant suite à la formation du DISC, la formation d'un second complexe de signalisation, le complexe II, au cours de la signalisation de CD95 a été mis en évidence dans

différentes lignées lymphocytaires B et T. Ce complexe cytosolique, composé de la procaspase 8, des différentes formes de cFLIP et de FADD mais pas de CD95, permettrait d'amplifier l'activation des caspases (Lavrik *et al.*, 2008). La formation de deux complexes consécutifs a également été proposée dans la signalisation du TNFR1. Le TNFR1 est en effet capable de recruter FADD et d'activer la cascade apoptotique, de façon indirecte, *via* l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice nommée TRADD (pour TNFR-Associated *via* death domain) (Hsu *et al.*, 1995). TRADD est aussi responsable du recrutement de la sérine/thréonine kinase RIP1 (pour Receptor (TNFRSF)-Interacting Protein) qui peut être à l'origine de voies des signalisations en faveur de la survie cellulaire ou de la mort (Hsu *et al.*, 1996a ; Hsu *et al.*, 1996b). L'équipe de Jurg Tschopp a observé la formation de deux complexes consécutifs, le complexe I comprenant le TNFR1 lui-même, TRADD, RIP1 et TRAF2 et le complexe II, formé après l'internalisation du TNFR1 et sa dissociation du complexe 1, regroupant TRADD, RIP1, FADD et la caspase 8 (Micheau & Tschopp, 2003). Ceci reste toutefois controversé, puisqu'un second modèle propose que le TNFR1 doit être internalisé pour former un DISC composé de TRADD, FADD et caspase 8, tandis que dans des cellules exprimant un TNFR1 ne pouvant être internalisé, un recrutement de RIP1 et TRAF2 par le TNFR1 est observé au niveau de la membrane plasmique (Schneider-Brachert *et al.*, 2004). Ce complexe II existerait également dans la signalisation de TRAIL et serait composé de FADD, caspase-8, RIP1, TRAF2 et NEMO (IKK γ) et permettrait l'activation de JNK et p38 et NF κ B (Varfolomeev, 2005).

1.2.3.2.2. Les événements membranaires : l'initiation membranaire du signal et l'internalisation des récepteurs de mort.

En l'absence de stimulation, les récepteurs CD95, tout comme DR4 et DR5, sont pré-associés en trimères inactifs dont la formation dépend de la présence du domaine extracellulaire PLAD. Cette pré-association est nécessaire à l'induction du signal apoptotique par CD95L (Siegel, 2000).

Dans les toutes premières secondes suivant la liaison de CD95L sur son récepteur, donc avant l'activation de la caspase 8, les récepteurs CD95 seraient regroupés en agrégats de 90 à 200 kDa résistants aux SDS et au mercaptoéthanol parfois nommés « CD95^{hi} » dont la formation serait nécessaire à l'induction de la signalisation apoptotique sous-jacente (Algeciras-Schimnich & Peter, 2002 ; Kamitani *et al.*, 1997 ; Papoff *et al.*, 1999 ; Kischkel *et al.*, 1995 ; Feig *et al.*, 2006). Une équipe a proposé qu'il existerait en réalité plusieurs sous-

types de ces micro-aggrégats résistants au SDS, au moins trois, de 90 kDa, 200 kDa et 180 kDa (correspondants au « CD95hi ») en SDS-PAGE. FADD et la caspase-8 seront ensuite préférentiellement recrutées au sein de ces structures CD95hi pour former des hiDISC (pour high molecular weight DISC) (Feig *et al.*, 2006). La formation de ces hiDISC serait dépendante de la palmitoylation du récepteur CD95. La formation physiologique des micro-aggrégats résistants au SDS, ainsi que leur rôle exact dans l'induction de la signalisation apoptotique sous-jacente ont été controversés. En effet, la formation de ces aggrégats semble être seulement la résultante de l'utilisation d'anticorps agonistes anti-CD95 et est absente lorsque les cellules testées sont traitées avec du CD95L sous sa forme soluble ou membranaire non étiquetés (Legembre *et al.*, 2003). Une étude antérieure a également suggéré qu'il n'existe pas de corrélation entre la formation des micro-aggrégats de CD95 et la sensibilité à l'apoptose médiée par CD95 (Lee & Shacter, 2001).

Il a été mis en évidence que le récepteur CD95 pouvait se localiser au sein de microdomaines membranaires particulier appelés rafts, ou radeaux lipidiques, enrichis en sphingolipides et en cholestérol, dont le démantèlement inhiberait l'induction d'apoptose dépendante de CD95 (Hueber *et al.*, 2002 ; Eramo *et al.*, 2004 ; Muppidi & Siegel, 2004 ; Legembre *et al.*, 2006). La localisation de CD95 au sein de ces microdomaines serait constitutive pour certains types cellulaires, dits de type I, tandis qu'elle serait induite par CD95L pour les cellules dites de type II, un processus apparemment indépendant de la formation du DISC et de la présence du DD de CD95 (cf. chapitre I.2.6) (Eramo *et al.*, 2004 ; Muppidi & Siegel, 2004). Il a notamment été mis en évidence que certaines molécules de chimiothérapie pouvait favoriser la localisation et l'aggrégation des récepteurs CD95 au sein des rafts (Gajate *et al.*, 2004 ; Gajate & Mollinedo, 2007). Les récepteurs CD95, en association avec CD95L sous sa forme membranaire, formeraient également des clusters supra moléculaires qui persisteraient plusieurs heures (Henkler *et al.*, 2005). La formation de ces clusters est indépendante de la présence du domaine intracellulaire de CD95, de FADD, contrairement aux clusters formés en présence de CD95L soluble. De plus, les clusters formés par l'utilisation de CD95L membranaire sont également observés en présence de la méthyl- β cyclodextrine qui déplete les cellules en cholestérol, et déstabilise donc la structure des rafts, contrairement à ceux formés avec du CD95L soluble.

Une étude a également mis en évidence une étape suivante qui correspond à la formation de SPOTS (pour Signaling Protein Oligomeric Transduction Structures), des agrégats de récepteur CD95 à la surface cellulaire, colocalisés avec des composants des rafts, et dont la formation nécessite la présence de FADD et d'un DD intact sur CD95 mais ne dépend pas de l'activité caspase (Siegel *et al.*, 2004).

L'étape suivante serait celle du capping ou du clustering, c'est-à-dire la formation de très larges regroupements (caps ou clusters) latéraux de récepteurs qui sont rapidement internalisés (Algeciras-Schimmich & Peter, 2002). La localisation de CD95 au sein des rafts ainsi que la formation des caps sont augmentées, par des élévations de céramide, un sphingolipide pro-apoptotique (cf. chapitre II.3.2.2) (Cremesti, 2001 ; Grassmé *et al.*, 2003).

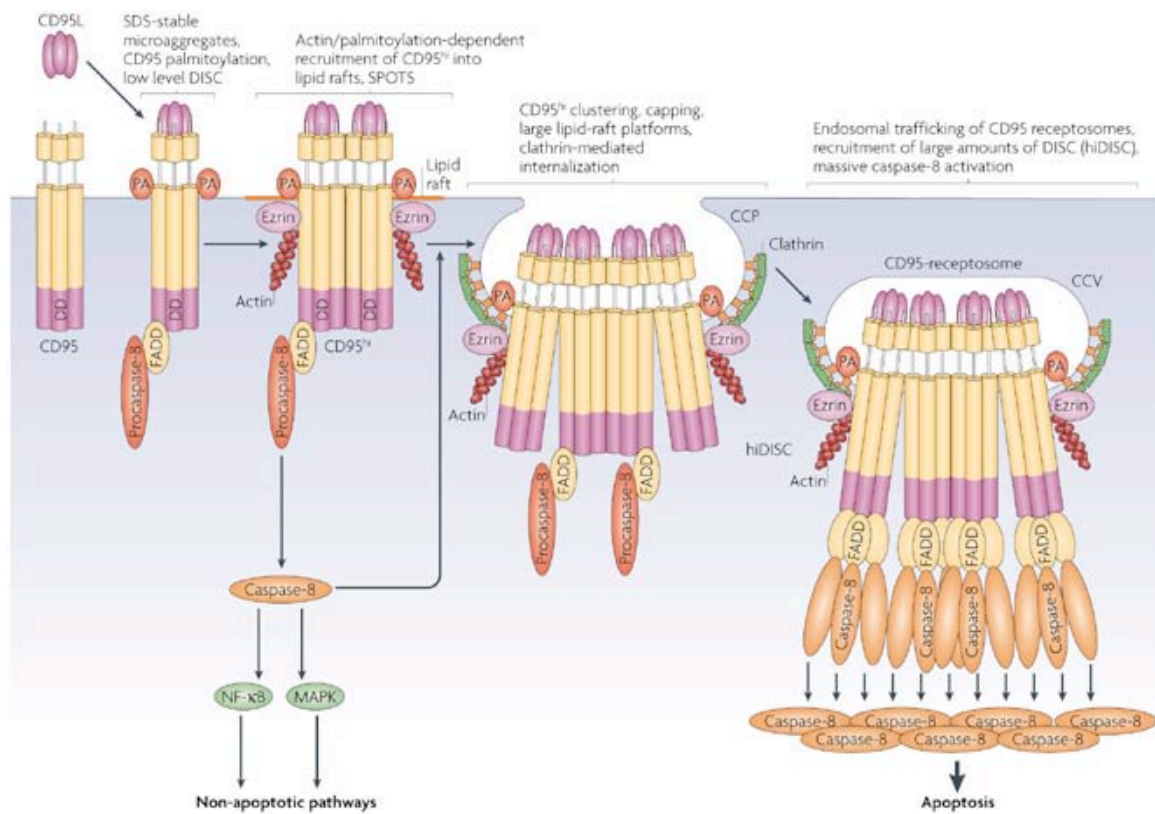


Figure 9. Chronologie potentielle des événements de signalisation émanant de CD95. L'interaction CD95-CD95L provoque dans un premier temps la formation de micro-agrégats de CD95 résistants au SDS, les CD95hi qui vont transloquer au sein des radeaux lipidiques. Ce phénomène de translocation serait dépendant de la palmitoylation de CD95 et de l'association de CD95 au cytosquelette d'actine via l'eZRIN. Une première vague de recrutement de FADD et de la caspase 8 en petite quantité aurait alors lieu. L'étape suivante est la formation de SPOTS ce qui conduit au capping ou clustering des récepteurs CD95. CD95 serait alors capable d'induire l'activation de la voie des MAPK et de NFκB, voies en faveur de la prolifération cellulaire. L'étape suivante consiste en une internalisation clathrine et eZRIN dépendante des récepteurs, phénomène en l'absence duquel l'apoptose ne peut être induite dans des cellules de type I. Au cours de l'internalisation, des quantités plus importantes de composants du DISC sont recrutés, permettant l'activation de la caspase 8 au sein de complexes de plusieurs mégadaltons (hiDISC), et l'induction de la signalisation apoptotique sous-jacente. CCP, clathrin-coated pit; CCV, clathrin-coated vesicle (Schütze *et al.*, 2008)

La dernière étape correspondrait à l'internalisation des récepteurs CD95, étape majeure dans les cellules de type I (Eramo *et al.*, 2004 ; Algeciras-Schimnich & Peter, 2003). Cette étape d'internalisation est induite indifféremment par du CD95L soluble ou membranaire, dépend de la polymérisation du cytosquelette d'actine et met en jeu un phénomène d'endocytose par des vésicules à clathrine (Lee *et al.*, 2006). De plus, les différents composants du DISC seraient préférentiellement recrutés au sein des récepteurs CD95 du compartiment endosomal et l'inhibition du phénomène d'internalisation dans les cellules de type I diminue le recrutement des composants du DISC et l'induction de la signalisation apoptotique (Lee *et al.*, 2006). L'inhibition de l'internalisation induite par CD95L induit une génération de signaux prolifératifs mettant en jeu Erk et NFκB (Lee *et al.*, 2006). La palmitoylation du récepteur CD95 est nécessaire pour sa redistribution au sein des radeaux lipidiques et son association à l'ezrine et au cytosquelette d'actine, qui joue un rôle important dans son internalisation et l'induction du signal de mort sous-jacent (Chakrabandhu *et al.*, 2006). Une région de CD95, située du côté intra-cytoplasmique, riche en lysine jouerait également un rôle important dans la localisation de CD95 dans les rafts et dans son internalisation (Rossin *et al.*, 2010). Toutefois, l'importance de l'internalisation de CD95 dans les cellules de type I et l'implication du cytosquelette d'actine dans la signalisation apoptotique induite par le ligand naturel, sous forme soluble ou membranaire, a récemment été controversée (cf. chapitre I.2.6) (Chaigne-Delalande *et al.*, 2009). Dans le cas du TNFR1, et quel que soit le modèle de formation des complexes signalisants considéré, l'internalisation est primordiale pour l'induction d'une signalisation pro-apoptotique. Toutefois, l'importance de l'internalisation des DR dans l'induction d'une signalisation apoptotique est également remise en cause par l'observation selon laquelle les récepteurs de TRAIL, bien qu'ils puissent subir ce phénomène, ne nécessitent pas d'être internalisés pour induire un signal apoptotique (Kohlhaas *et al.*, 2007).

1.2.4. La voie intrinsèque.

La voie de signalisation intrinsèque est induite par différents stress cellulaires, tels que l'induction de dommages à l'ADN (par des radiations ou des molécules de chimiothérapie par exemple), le détachement des cellules de la matrice extra-cellulaire ou encore la privation en facteurs de croissance. Quand il s'agit d'une réponse à l'induction de dommages à l'ADN, l'activation de cette voie met souvent en jeu la protéine p53, un facteur de transcription, fréquemment muté, délété ou inactivé dans les cellules cancéreuses. La voie intrinsèque

implique une perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, qui permet le relargage de facteurs issus de l'espace intermembranaire mitochondrial, conduisant à l'activation des caspases et à l'apoptose cellulaire. Cette perméabilisation est un évènement très finement régulé par les membres de la famille d'une protéine nommée Bcl-2 (pour B-cell-lymphoma-2). La perméabilisation est fréquemment précédée, accompagnée ou suivie d'une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$). La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie aboutit, *in fine*, à la mort de la cellule car elle permet, d'une part, le relargage de facteurs activateurs des caspases ainsi que de molécules effectrices de la mort caspase-indépendante et, d'autre part, une altération du métabolisme de la mitochondrie qui est nécessaire à la survie cellulaire. Parmi les nombreux facteurs relargués, le cytochrome c conduit à la formation d'une plateforme de signalisation appelée l'apoptosome, permettant l'activation de la caspase initiateur 9.

1.2.4.1. Présentation des membres de la famille de Bcl-2.

Bcl-2 a initialement été découverte *via* l'observation d'une translocation chromosomique (t 14:18) fréquente dans les lymphomes folliculaires B (Tsujiimoto *et al.*, 1985). En effet, le gène codant pour cette protéine est fréquemment transloqué dans ce type de pathologies et se retrouve dépendant d'un promoteur de gènes codants pour les chaînes lourdes des immunoglobulines (Bakhshi *et al.*, 1985). Ainsi surexprimée, Bcl-2 favoriserait la survie cellulaire en s'opposant à la mort cellulaire par apoptose. Bcl-2 fut ainsi un des premiers oncogènes découverts dont la surexpression n'avait pas pour effet de favoriser directement la prolifération cellulaire mais était associée à une capacité de résistance à l'induction de mort, renforçant l'idée selon laquelle la capacité de résister à la mort cellulaire peut également participer au développement tumoral (Vaux *et al.*, 1988).

On distingue actuellement plusieurs dizaines de protéines au sein de la famille de Bcl-2, regroupées en trois groupes : un groupe de protéines homologues à Bcl-2 en terme de structure et de fonction, et qui regroupe donc les membres anti-apoptotiques, et deux autres groupes de protéines qui jouent un rôle en faveur de l'apoptose (Figure 10). Tous les membres de cette famille possèdent au moins un domaine BH (pour Bcl-2 Homology domain ou domaine d'homologie à Bcl-2). Certains membres possèdent également un domaine transmembranaire, ce qui permet leur ancrage à la membrane externe de la mitochondrie, au niveau du réticulum endoplasmique ou de l'enveloppe nucléaire. Le groupe des membres

anti-apoptotiques comprend en particulier Bcl-2 et Bcl-XL qui possèdent 4 domaines d'homologie à Bcl-2 (BH1, 2, 3 et 4) et sont localisées au niveau mitochondrial en l'absence de stimuli apoptotique (Youle & Strasser, 2008). Au sein des membres pro-apoptotiques, on distingue deux groupes. Le premier, celui des membres « BH3-only », regroupe des protéines qui ne possèdent qu'un seul domaine BH, le domaine BH3, constitué d'une vingtaine d'acides aminés (Huang & Strasser, 2000). Ce groupe comprend entre autres les membres Bid, Bad, Bim, Noxa et Puma. Ces membres BH3-only sont essentiels à l'apoptose ayant lieu au cours du développement embryonnaire et leur activation constitue la première étape de régulation des membres de cette famille par un stimulus apoptotique. Parmi eux, Bid, un substrat de la caspase 8, constitue un lien entre la voie extrinsèque, initiée par les DR, et la voie mitochondriale. En effet, le clivage de Bid par la caspase 8 permet la formation d'une forme clivée appelée t-Bid (pour truncated Bid, ou Bid tronqué) qui peut alors transloquer du cytosol vers la membrane externe de la mitochondrie pour favoriser le phénomène de perméabilisation (Li *et al.*, 1998 ; Luo *et al.*, 1998). Le second groupe de membres pro-apoptotiques est constitué de membres possédant plusieurs domaines d'homologie à Bcl-2. Il comprend les membres Bax, Bak (et Bok, moins étudié) qui possèdent chacun trois domaines d'homologie à Bcl-2. Les membres anti-apoptotiques et pro-apoptotiques peuvent s'associer en hétérodimère, ce qui inhibe leurs fonctions respectives. Au niveau mécanistique, le domaine BH3 d'un membre pro-apoptotique pourrait se loger au sein d'une poche hydrophobe formée par les domaines BH1 BH2 et BH3 d'un membre anti-apoptotique, permettant l'inhibition fonctionnelle.

Bax et Bak sont essentiels à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie en réponse à de nombreux stimuli pro-apoptotiques (Wei, 2001). Ainsi, les membres BH3-only ne pourraient induire l'apoptose cellulaire dans des cellules doublement déficientes pour Bax et Bak (Cheng *et al.*, 2001 ; Zong *et al.*, 2001). De plus, les souris doublement déficientes pour Bax et Bak présentent de nombreux défauts morphologiques tels que l'absence de formation d'espaces inter-digitaux et d'un canal vaginal, une splénomégalie et des lymphadénopathies. Bax et Bak semblent donc également impliqués dans l'apoptose cellulaire ayant lieu au cours du développement embryonnaire (Lindsten *et al.*, 2000). Deux modèles d'activation de Bax/Bak ont été proposés dans la littérature. Un premier modèle, dit « d'activation directe », ou « d'activation-dérépression », stipule que, suite à leur activation, certains membres BH3-only nommés les activateurs, tels que Bim et tBid, lient et activent Bak et Bax tandis que d'autres, les sensibilisateurs, tel que Bad, lient les membres anti-

apoptotiques induisant la libération des activateurs (Letai *et al.*, 2002) (Figure 10). Un second modèle, « d'activation indirecte », propose qu'en l'absence de stimulus apoptotique, les membres anti-apoptotiques séquestrent les membres du groupe de Bax et Bak et que le stimulus apoptotique active les membres BH3-only, dont l'affinité augmente pour les membres anti-apoptotiques qu'ils vont directement séquestrer, ce qui laisse donc libre les membres du groupe Bax et Bak qui participeraient à la perméabilisation mitochondriale (Willis *et al.*, 2007) (Figure 10). Dans les deux modèles, les membres BH3-only doivent donc être activés en réponse à un stimulus apoptotique pour permettre l'activation de Bax et Bak. Une étude récente, utilisant des souris triple KO Bid Bim Puma suggère que ces trois protéines seraient les membres BH3-only principaux, les plus en amont de l'activation de Bax et Bak (Ren *et al.*, 2010). L'utilisation de molécules pharmacologiques mimant l'action de membres BH3-only pourrait ainsi être envisagée en thérapie anti-cancéreuse afin de favoriser l'induction de la voie mitochondriale. Par exemple, l'ABT-737, un BH3-only mimétique, capable de lier et neutraliser Bcl-2, Bcl-XL et Bcl-W a été montré comme pouvant induire une régression de tumeurs dérivées de lignées cellulaires de cancer du poumon à petites cellules chez la souris (Oltersdorf *et al.*, 2005).

Physiologiquement, la modulation de l'action des membres de la famille de Bcl-2 peut être la résultante de modifications transcriptionnelles ou post-traductionnelles, certains membres semblant être activés de façon préférentielle selon le stress cellulaire considéré. Par exemple, la privation en facteur de croissance activerait particulièrement Bim et Bad et l'induction de dommages à l'ADN, Puma et Noxa. Au niveau transcriptionnel, l'expression du gène codant pour Bax pourrait être augmentée suite à l'activation de p53 ou de l'oncoprotéine c-Myc (Miyashita & Reed, 1995 ; Mitchell *et al.*, 2000). Au niveau post-traductionnel, Bax peut être phosphorylé par JNK (Jun Kinase) et p38 MAPK, conduisant à son activation et à sa translocation à la mitochondrie (Kim, 2006). Des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation pourraient également influencer l'interaction entre les différents membres de cette famille. Ainsi, la protéine BH3-only Bad peut être phosphorylée par Akt/PKB en réponse à des facteurs de survie cellulaire et perdre ainsi son affinité pour la protéine anti-apoptotique Bcl-XL ainsi que sa localisation mitochondriale. Bad phosphorylée devient alors affine pour la protéine 14-3-3 qui séquestre Bad dans le cytoplasme, permettant à Bcl-XL libérée de jouer son rôle anti-apoptotique (Zha *et al.*, 1996). Un autre mécanisme régulateur possible de l'action de ces protéines est également leur

clivage, l'exemple classique concernant Bid dont le clivage par les caspases 8 et 10 favorise la localisation mitochondriale.

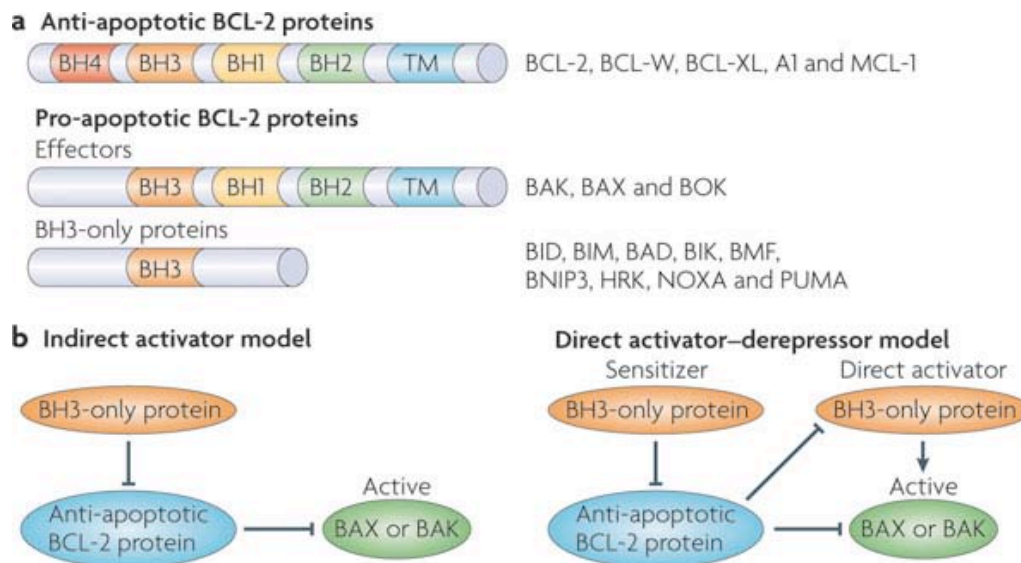


Figure 10. Structure et fonctionnalité des membres de la famille de Bcl-2. **A :** Les membres anti-apoptotiques comportent 4 domaines BH (numérotés de 1 à 4). Les membres apoptotiques sont subdivisés en membres « BH3-only », ne comportant que le domaine BH3 et en membres effecteurs qui participeraient directement à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et qui possèdent les domaines BH 1 à 3. **B :** Selon le modèle d'activation indirecte, Bax et Bak seraient constitutivement pré-associés aux membres anti-apoptotiques. L'interaction des membres BH3-only avec les membres anti-apoptotiques permettrait alors la libération de Bax et Bak pouvant jouer leur rôle d'effecteur. A l'inverse, le modèle direct d'activation-dérépression stipule que certains membres BH3-only jouent le rôle d'activateurs de Bax et Bak (tels que t-Bid ou Bim) et d'autres (tels que Bad et Noxa) sont des sensibilisateurs qui lient les membres anti-apoptotiques permettant la libération des membres activateurs BH3-only et des effecteurs. Les deux modèles pourraient coexister dans la cellule. BAD, BCL-2 antagonist of cell death; BID, BH3-interacting domain death agonist; BIK, BCL-2-interacting killer; BIM, BCL-2-interacting mediator of cell death; BMF, BCL-2-modifying factor; BNIP3, BCL-2 and adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3; HRK, harakiri; PUMA, p53 upregulated modulator of apoptosis; TM, transmembrane domain (Tait & Green, 2010).

1.2.4.2. Les mécanismes de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pouvant mener à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et le débat reste entier quant à la pertinence et l'importance physiologique de chacune des possibilités proposées. Ci-après seront brièvement décrits les principaux mécanismes envisagés dans la littérature (Figure 11).

L'activation de Bax ou de Bak a été proposée comme étant essentielle à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (ou MOMP pour Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization). En effet, des cellules doublement déficientes pour ces

protéines ne présentent aucune MOMP en réponse à plusieurs signaux mettant en jeu la voie mitochondriale de l'apoptose, comme l'incubation en présence de staurosporine, d'étoposide, d'agents inducteurs du stress du RE ou l'exposition à des radiations ultra-violettes (Wei, 2001). Il a été mis en évidence que divers stimuli apoptotiques induisent une translocation de Bax de la fraction cytosolique aux fractions membranaires (Hsu *et al.*, 1997). tBid se liant à Bax induirait ainsi un changement conformationnel aboutissant à la translocation de Bax du cytosol vers la mitochondrie et à son oligomérisation menant à la formation de pores permettant le relargage du cytochrome c (Korsmeyer *et al.*, 2000 ; Eskes *et al.*, 2000 ; Desagher *et al.*, 1999). t-Bid serait également capable d'induire l'oligomérisation de Bak (Wei *et al.*, 2000). A l'inverse, Bcl-XL serait capable de faciliter la translocation de Bax de la mitochondrie au cytosol (Edlich *et al.*, 2011). La capacité d'homo-oligomérisation de Bax et de Bak serait ainsi nécessaire au phénomène de MOMP. Bax et Bak participeraient à la formation de MACs (pour Mitochondrial Apoptosis-inducing Channels), des canaux permettant le relargage du cytochrome c et dont la taille augmenterait au fur et à mesure du phénomène de perméabilisation (Dejean *et al.*, 2005). Toutefois, Bax et Bak ne seraient pas nécessairement les seuls composants de ces canaux (Figure 11C).

Il a également été proposé que certains canaux pré-existants au niveau mitochondrial soient activés en réponse à un stimuli apoptotique. Ainsi, le PTPC (Permeability Transition Pore Complex), un canal multiprotéique, comprenant en particulier le canal ionique voltage dépendant (VDAC pour Voltage Dependent Anion Channel) et la translocase de nucléotides adényliques (ANT pour Adenine Nucleotide Transporter), avait initialement été proposé comme pouvant participer à cette perméabilisation. L'ouverture de ces pores suite à un stimulus apoptotique induirait une dissipation de potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), le relargage des facteurs de l'espace inter-membranaire et la rupture de la membrane externe de la mitochondrie (Figure 11B). Toutefois, cette hypothèse a été remise en cause par l'observation selon laquelle la déficience en certains de ses composants n'inhibait pas le phénomène de perméabilisation en réponse à certains stimuli apoptotiques (Nakagawa *et al.*, 2005). De plus, la libération de facteurs solubles tels que le cytochrome c ne nécessite pas de dépolarisation transmembranaire de la mitochondrie (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998).

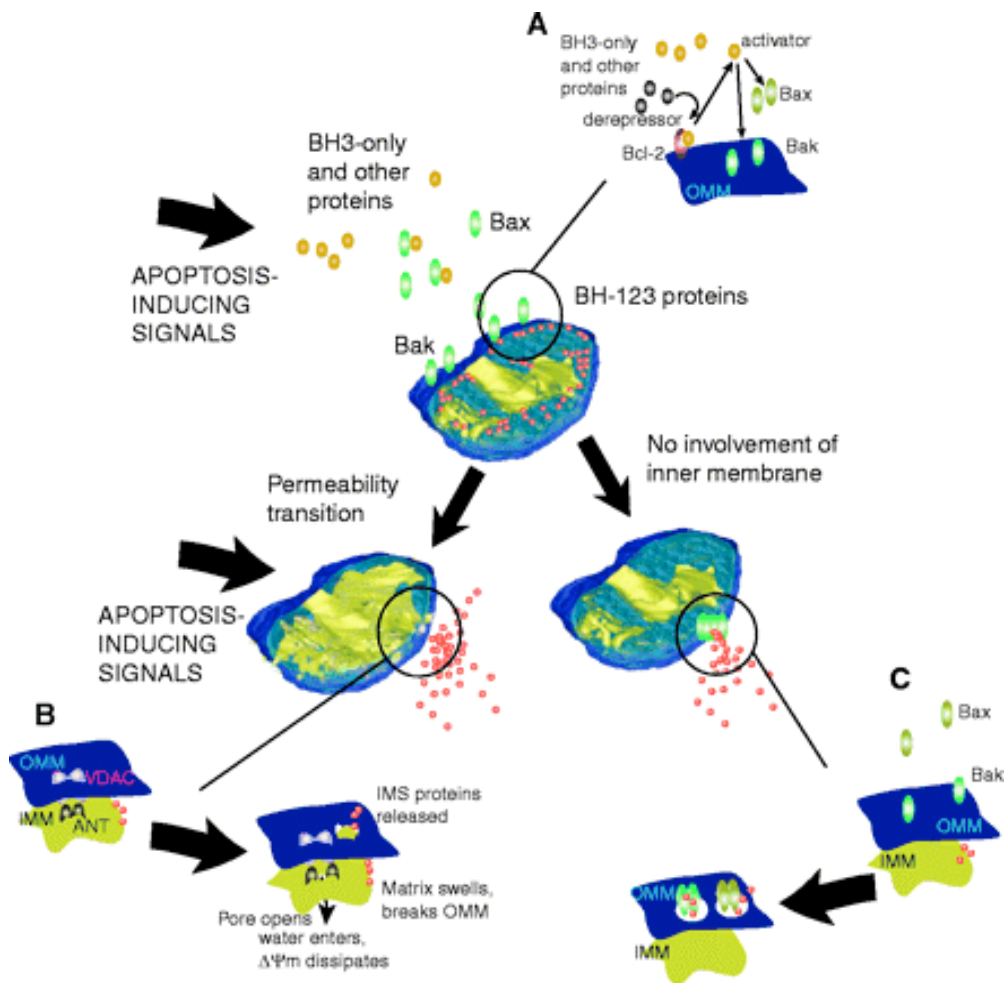


Figure 11. Mécanismes de la MOMP au cours de l'apoptose. A : Initiation de la perméabilisation selon le modèle activation-dé-répression (cf. chapitre I.2.4.1). **B :** Dans le modèle de MOMP dépendante du PTPC, le signal apoptotique conduit à l'ouverture du PTPC, composé de l'ANT et d'autres protéines de la membrane interne mitochondriale associé au VDAC et d'autres protéines de la membrane externe de la mitochondrie, ainsi que des protéines matricielles. L'ouverture du pore permettrait l'entrée d'eau dans la matrice et des mouvements ioniques, ce qui dissiperait le potentiel $\Delta\psi_m$. La rupture de la membrane externe de la mitochondrie conduirait au relargage des protéines de l'espace intermembranaire. **C :** Dans le modèle PTPC indépendant, les protéines Bax et Bak, potentiellement associées à d'autres protéines, induisent la formation de pores au sein de la membrane externe de la mitochondrie par lesquels les facteurs solubles sortent de l'espace intermembranaire (Green & Kroemer, 2004).

Bax et Bak pourraient également réguler, de façon positive ou négative, la fonction de composants du PTPC, comme VDAC. Enfin, certains auteurs ont suggéré que l'interaction de Bax et Bak avec des lipides membranaires pourrait favoriser la formation de pores de composition lipidique (Kuwana *et al.*, 2002). Certains lipides, tels que la cardiolipine mais aussi le céramide pourraient participer à la formation de canaux à la membrane mitochondriale (cf. chapitre II.3.2.1).

1.2.4.3. Les facteurs mitochondriaux relargués.

Plusieurs facteurs relargués par la mitochondrie vont moduler de façon plus ou moins directe l'activation des caspases, tandis que d'autres participent à une mort caspase-indépendante.

Le cytochrome c est nécessaire à l'activation des caspases suite à la MOMP. Il a été observé que des cellules ne possédant pas de cytochrome c sont moins sensibles à l'apoptose mettant en jeu la voie mitochondriale (Li *et al.*, 2000). Il joue en effet un rôle important dans la constitution de l'apoptosome (cf. chapitre 1.2.4.4). Smac/DIABLO (pour Second-Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP Binding protein with LOW pI) est un facteur, relargué par la mitochondrie au cours de l'apoptose, capable d'interagir avec et ainsi d'inhiber l'action des XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Proteins), des inhibiteurs des caspases (cf. chapitre 1.2.7.1) (Du *et al.*, 2000 ; Verhagen *et al.*, 2000 ; Srinivasula *et al.*, 2001). De façon similaire, HtrA2/Omi est capable de bloquer les XIAP (Suzuki *et al.*, 2001). HtrA2/Omi, qui possède une activité sérine protéase, est également capable de favoriser la mort cellulaire en liant et dégradant Ped/Pea15, une protéine à domaine DED capable d'inhiber la formation du DISC, l'activation de la caspase 8 et l'apoptose induite par CD95L et TRAIL (Trencia, 2004).

AIF (pour Apoptosis Inducing-Factor) est également relargué depuis l'espace intermembranaire au cours de l'apoptose mais de façon relativement lente en comparaison au cytochrome c. Ce facteur semble jouer un rôle important dans l'apoptose ayant lieu au cours du développement embryonnaire (Joza *et al.*, 2001). AIF participe à la condensation et à la fragmentation chromatiniennne et sa fonction pro-apoptotique est indépendante de la présence de la caspase-9 ou d'Apaf-1. L'endonucléase G est également relarguée au cours de l'apoptose et participerait également à une mort indépendante de l'activité des caspases. Cette protéine est transloquée de la mitochondrie au noyau au cours de l'apoptose, où elle participe à la fragmentation internucléosomale de l'ADN (Li *et al.*, 2001).

1.2.4.4. La formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9.

Parmi les facteurs mitochondriaux relargués, le cytochrome c libéré va interagir avec une protéine nommée Apaf-1 (pour Apoptotic Peptidase Activating Factor 1) qui est présente

sous forme de monomère et dans une conformation inactive à l'état basal (Zou *et al.*, 1997). L'interaction Apaf-1-cytochrome c s'accompagne d'une hydrolyse de dATP ou d'ATP par Apaf-1 et de la modification de sa conformation. Puis, le remplacement de l'ADP ou de dADP par une nouvelle molécule d'ATP ou de dATP permet de modifier une seconde fois la conformation d'Apaf-1 qui s'assemble alors en heptamère et recrute la pro-caspase 9 (Acehan *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2005) (Figure 12). Le recrutement de pro-caspases 9 est réalisé *via* une interaction homotypique entre le domaine CARD de la caspase 9 et celui d'Apaf-1 (Li *et al.*, 1997). Ce complexe heptamérique constitue l'apoptosome et permet l'activation de la pro-caspase 9.

La caspase 9, comme les caspases 8 et 10, est présente sous forme de monomères inactifs en dehors de toute stimulation apoptotique (Renuis *et al.*, 2001). Plusieurs modèles d'activation de la pro-caspase 9 au sein de l'apoptosome ont été proposés. Un premier modèle dit de conformation induite, suggère une auto-activation d'un seul monomère de caspase 9 suite à sa liaison sur Apaf-1 qui induirait un changement de conformation du monomère ou une activation simultanée de plusieurs monomères liés à Apaf-1 de façon indépendante. Un second modèle dit de « dimérisation proximité-induite » stipule que l'apoptosome permettrait un recrutement de plusieurs monomères de pro-caspase-9 qui, ainsi mis à proximité, s'associeraient en dimères ce qui permettrait leur activation. Certains groupes ont de plus suggéré que le clivage de la caspase-9, contrairement à son oligomérisation, ne semble ni réellement nécessaire ni suffisant à son activation (Stennicke *et al.*, 1999 ; Pop *et al.*, 2006). Ainsi, une autre possibilité serait que la caspase 9 soit activée dans un homo-oligomère de grande taille et que sa conformation sous forme active soit à la fois stabilisée par cette homo-oligomérisation et par l'interaction avec Apaf-1 (Shi, 2004). Quelque soit le modèle considéré, l'association de la caspase 9 à l'apoptosome permet son activation et cette caspase ainsi activée va alors jouer son rôle d'initiatrice en activant les caspases effectrices. L'activité de la caspase 9 peut également être négativement régulée par phosphorylation sur la serine 196, par la serine thréonine kinase Akt (Cardone, 1998) ou sur la thréonine 125 par Erk1, Erk2 ou cdk1-cycline B1.

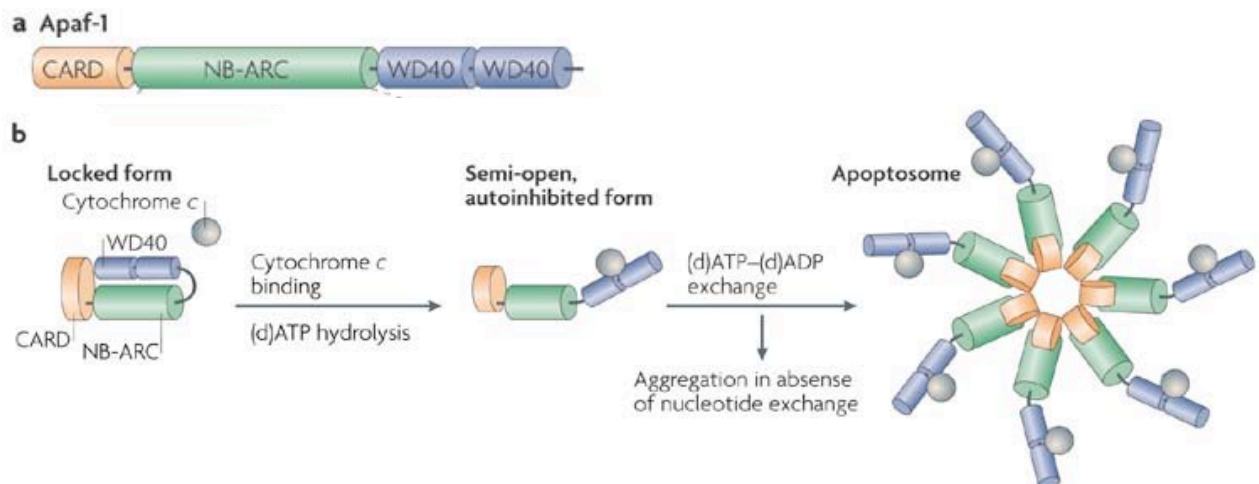


Figure 12. Structure d'Apaf-1 et constitution de l'apoptosome. **A :** Apaf-1 possède : un domaine CARD N-terminal qui lui permet d'interagir avec la caspase-9 ; une région de liaison de nucléotide et d'oligomérisation (région NOD ou NB-ARC) qui comprend un domaine ATPase et permet son oligomérisation (d)ATP-dépendante ; une région C-terminale WD40 d'environ 40 acides aminés avec des répétitions WD qui permet l'interaction d'Apaf-1 avec le cytochrome C. **B :** A l'état basal, Apaf-1 est un monomère en conformation inactive ou fermée (locked form). La liaison du cytochrome c au niveau de la région de répétitions WD40 C-terminale permet à Apaf-1 d'acquies une conformation toujours inhibitrice et qualifiée de semi-ouverte (semi-open). Cette liaison est concomitante à l'hydrolyse de (d)ATP en ADP par la partie ATPase d'Apaf-1 au sein du domaine NB-ARC. Un échange nucléotidique de (d)ADP remplacé par du (d)ATP permet ensuite l'oligomérisation en heptamère d'Apaf-1 et la formation de l'apoptosome, avec un regroupement central de plusieurs domaines CARD permettant le recrutement et l'activation de plusieurs pro-caspases 9 (Riedl & Salvesen, 2007).

L'activation de la caspase-9 suite à la formation de l'apoptosome serait un phénomène important dans la réponse à la chimiothérapie et à d'autres stress cellulaires classiquement décrits comme favorisant la voie intrinsèque de l'apoptose, mais également en réponse à certains ligands de morts, dans certains types cellulaires. Il a ainsi été mis en évidence que des cellules Jurkat déficientes en caspase-9 présentaient une résistance partielle à l'apoptose induite par un anticorps anti-CD95 agoniste ou par TRAIL (Samraj, 2006). La caspase 9 est également primordiale au cours du développement embryonnaire cérébral. Ainsi, les souris KO pour la caspase-9 meurent massivement à l'état embryonnaire ou dans les premiers jours suivant leur naissance et présentent des malformations et des hypertrophies cérébrales liées à un défaut d'apoptose (Hakem *et al.*, 1998 ; Kuida *et al.*, 1998), un phénotype assez similaire étant observé chez des souris déficientes pour Apaf-1 (Yoshida *et al.*, 1998).

1.2.4.5. Le PIDDosome et l'activation de la caspase 2.

Les souris déficientes en caspase initiateur 2 ne présentent pas d'anomalies phénotypiques sévères, contrairement à ce qui est observé par exemple chez des souris

caspase-8 déficientes (Bergeron *et al.*, 1998). Toutefois, certaines cellules de ces souris ont une réponse altérée à différents types de stress. Ainsi, les lymphoblastes B de souris caspase-2 déficientes présentent un défaut d'apoptose induite par Granzyme/perforine (Bergeron *et al.*, 1998). Leurs ovocytes, dont le nombre est augmenté, ne sont pas sensibles à l'apoptose induite par la doxorubicine. A l'inverse, l'apoptose des moto-neurones est augmentée chez des souris caspase-2 déficientes (Bergeron *et al.*, 1998). Il a été suggéré que cette caspase joue un rôle important dans la réponse à des agents endommageant l'ADN (Lassus, 2002). Son action serait précoce puisqu'elle agirait en amont de la mitochondrie (Lassus, 2002). De façon similaire aux caspases 8, 9 et 10, l'activation de la caspase 2 dépendrait de son recrutement au sein de plateformes de signalisation. Comme évoqué précédemment, cette activation peut avoir lieu au sein du DISC (cf. chapitre I.2.3.2.1) dans le cas de la signalisation apoptotique émanant des DR. Dans le cas de stress génotoxiques, la caspase 2 serait activée suite à son recrutement au sein d'un complexe nommé le PIDDosome (Tinel & Tschopp, 2004). Le PIDDosome comprend la protéine RAIDD (pour RIP-Associated ICH-1/CED-3-homologous protein with a Death Domain) (CRADD pour Caspase and RIP Adaptator with Death Domain), identifiée en 1997 comme étant une protéine possédant un domaine N-terminal lui permettant une interaction homotypique avec le domaine CARD de la caspase-2, ainsi qu'un DD en C-terminal lui permettant de se lier à RIP (Duan & Dixit, 1997). Il avait ainsi été initialement proposé, à partir de données obtenues dans des modèles de surexpression, que RAIDD pourrait constituer un lien entre l'activation du TNFR1 et l'apoptose dépendante de la caspase 2 (Ahmad *et al.*, 1997 ; Duan & Dixit, 1997). Le PIDDosome comprend un troisième partenaire nommé PIDD (pour P53-Induced protein with a DD) dont l'expression est augmentée par l'activation de p53. PIDD est capable de lier le DD de RAIDD par une interaction homotypique (Tinel & Tschopp, 2004). Ce complexe caspase-2-RAIDD-PIDD est formé suite à un stress génotoxique et induit l'activation de la caspase 2 et l'apoptose (Tinel & Tschopp, 2004 ; Berube *et al.*, 2005) (Figure 13). Comme les caspases 8 et 10, la caspase 2 est en effet capable de cliver Bid et donc d'activer la voie mitochondriale de l'apoptose, cette action pouvant être indépendante de l'état de clivage de la caspase 2 (Wagner, 2004). La caspase 2 possède un signal de localisation nucléaire, et, bien que majoritairement cytosolique en condition basale, elle peut être transloquée au niveau nucléaire suite à l'induction de dommages de l'ADN. Elle est également retrouvée au niveau golgien où elle est capable de cliver la golgine 160 (Mancini *et al.*, 2000).

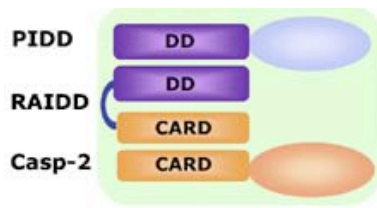


Figure 13. Le PIDDosome. Le PIDDosome comprend la protéine PIDD, dont le DD interagit avec le DD de la protéine RAIDD. Le domaine CARD de la protéine RAIDD interagit avec celui de la caspase 2 (Bao & Shi, 2006).

Le PIDDosome ne serait pas la seule plateforme permettant l'activation de la caspase-2 suite à un stress génotoxique étant donné que l'activation de cette caspase est observée dans des cellules PIDD déficientes (Manzl *et al.*, 2009). Ainsi, en l'absence de PIDD et de RAIDD, une équipe a également proposé qu'un stress génotoxique pouvait induire l'activation de la caspase 2 *via* son recrutement au sein du DISC de CD95 puis de son clivage caspase-8 dépendant (Olsson *et al.*, 2009). Il a également été proposé que l'état de phosphorylation de la pro-caspase 2 par la protéine kinase PKCK2 pouvait également moduler son activation et sa capacité à cliver la caspase 8, influençant ainsi l'apoptose induite par TRAIL et ceci de façon PIDDosome indépendante (Shin *et al.*, 2005).

Les mécanismes exacts d'activation et d'action de la caspase-2 restent donc méconnus. Une équipe a récemment mis en évidence que la caspase 2 peut être considérée comme une protéine suppresseur de tumeur, agissant à la fois comme modulatrice de l'apoptose et régulatrice de la progression dans le cycle cellulaire (Ho *et al.*, 2009). Il a également été mis en évidence que la caspase 2 peut interagir avec les membranes mitochondriales et induire le phénomène de MOMP de façon indépendante de son activité catalytique (Enoksson, 2004).

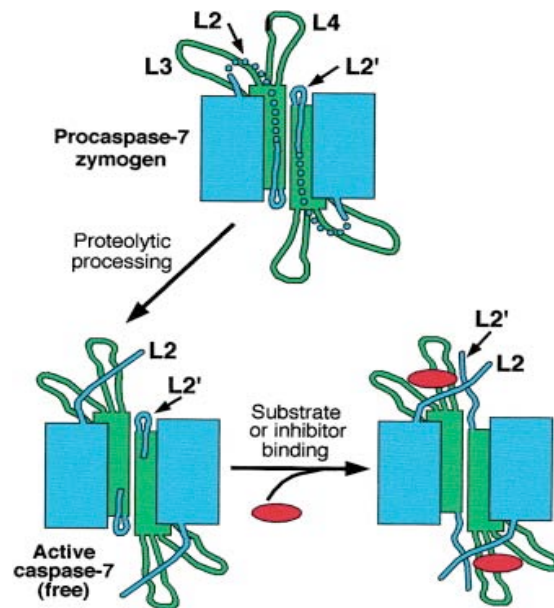
1.2.5. Activation des caspases effectrices et « exécution » de l'apoptose.

1.2.5.1. Mode d'activation des caspases effectrices.

Les pro-caspases effectrices sont constitutivement associées en dimères et le restent une fois activées. Chaque monomère composant ce dimère inactif est constitué d'une petite sous unité (p10) et d'une grande sous unité (p20) non dissociées, liées par un domaine intermédiaire. En réponse à un stimulus apoptotique, les caspases initiateuses actives clivent les caspases effectrices après des résidus aspartates, permettant ainsi leur activation. Les domaines p10 et p20 sont d'abord séparés par un ou deux clivages, puis le pro-domaine est séparé de la grande sous-unité (Ramage *et al.*, 1995 ; Yamin *et al.*, 1996). Le clivage entre les

deux sous-unités p10 et p20 induit un changement conformationnel qui permet l'alignement des différents sites de liaison du substrat et la localisation adéquate des résidus catalytiques permettant d'augmenter de façon drastique l'activité catalytique des caspases effectrices (Chai *et al.*, 2001 ; Riedl *et al.*, 2001). Le clivage d'un seul des deux domaines inter-sous unités du dimère permet ainsi une activation efficace et irréversible de la caspase 7 (Denault *et al.*, 2006) (Figure 14). Les caspases effectrices activées sont donc des dimères comportant deux sous unités p10 et deux sous unités p20.

Figure 14. Modèle d'activation de la caspase effectrice 7. La procaspase-7 est pré-associée en dimère, mais inactive, en l'absence de tout stimuli apoptotique. Le clivage entre chaque petite (en vert) et grande (en bleu) sous-unité permet un changement conformationnel menant à la libération des sites actifs (boucles L2) disponibles pour la liaison d'un substrat ou d'un inhibiteur (représenté en rouge) (Chai *et al.* 2001).

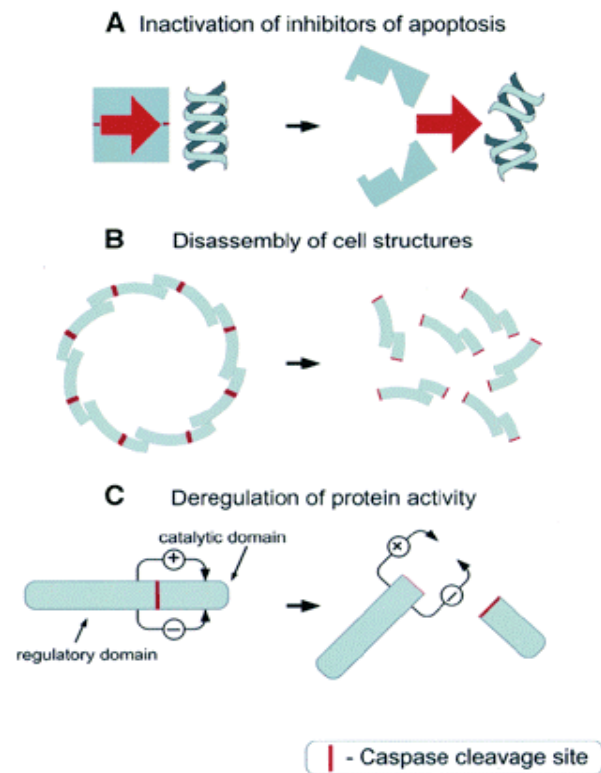


1.2.5.2. Substrats des caspases et rôle dans le démantèlement cellulaire.

Bien que toutes les caspases clivent leurs substrats en C-terminal d'un aspartate, elles possèdent des spécificités différentes. Ces différences dépendraient, au moins *in vitro*, de l'acide aminé présent en position P4 (Thornberry *et al.*, 1997). Il a ainsi été mis en évidence que les caspases 3, 7 et 2 cliveraient préférentiellement des substrats présentant un aspartate en position P4 alors que les caspases 6, 8, 9 et 10 seraient plus enclines à cliver des substrats comportant une leucine ou une valine en position P4 (Thornberry *et al.*, 1997). Les spécificités *in situ* sont probablement plus complexes, et dépendraient également des résidus P5 à P2, du résidu P1' et des structures tertiaires et quaternaires des substrats (Crawford & Wells, 2011). Alors que les caspases initiatrices semblent cliver peu de substrats, clivant préférentiellement les caspases effectrices, plusieurs centaines de substrats des caspases effectrices, presque 5% du protéome, sont actuellement connus (Crawford & Wells, 2011). Le clivage de certains substrats semble jouer un rôle primordial dans le processus apoptotique

alors que d'autres substrats seraient de simples « by-standers » de la protéolyse dont le clivage n'influencerait pas le processus de mort cellulaire. Le clivage par les différentes caspases se fait généralement en nombre limité, à un ou quelques sites précis. Cela peut résulter en une inactivation de la protéine cible, mais aussi en son activation, *via* par exemple le clivage d'une sous unité inhibitrice (Figure 15).

Figure 15. Modes d'action des caspases dans le démantèlement cellulaire. Les caspases participent au démantèlement cellulaire en : **A** : Inactivant des inhibiteurs de protéines en faveur de l'apoptose (ICAD par exemple) ; **B** : désassemblant des structures cellulaires (protéines du ou associées au cytosquelette, protéines de structure des organistes par exemple) ; **C** : dérégulant l'activité de protéines en séparant des domaines régulateurs de domaines catalytiques, ce qui peut résulter en une perte ou un gain de fonction (gelsoline par exemple) (Thornberry 1998).



Les caspases peuvent d'une part cliver et inactiver des protéines qui protègent la cellule de l'apoptose. C'est notamment le cas du clivage d'ICAD (pour Inhibitor of Caspase Activated Deoxyribonuclease), un inhibiteur de CAD qui est une nucléase participant à la fragmentation inter-nucléosomale de l'ADN au cours de l'apoptose. Le clivage d'ICAD par les caspases permet ainsi la libération de CAD active (Liu *et al.*, 1997 ; Enari *et al.*, 1998). Plusieurs facteurs intervenant dans la transcription et dans la traduction sont également substrats des caspases et leur clivage s'accompagne de leur perte de fonction. De plus, suite à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, les composants de la chaîne respiratoire deviennent accessibles aux caspases effectrices qui, en clivant certaines de ces protéines, conduisent à une perte rapide de la fonction métabolique de cet organite (Ricci *et al.*, 2004). À l'inverse, certains clivages induisent un gain de fonction de la protéine. Ainsi, dans le cas de Bid, le clivage permet de générer un fragment activateur de l'apoptose (Luo *et al.*, 1998) (cf. chapitre I.2.4). Il est également à noter que les caspases effectrices elles-mêmes sont capables de cliver les caspases initiatrices (Sohn, 2004).

De nombreux substrats des caspases sont des protéines de structure cellulaire dont la fonction est altérée suite à leur clivage. Ainsi, les différents réseaux formant le cytosquelette cellulaire sont démantelés suite au clivage de plusieurs des protéines qui le composent ou régulent leur structure. Un certain degré de démantèlement du cytosquelette serait ainsi nécessaire au phénomène de bourgeonnement de la membrane plasmique. L'actine et des protéines qui lui sont associées comme la gelsoline (Kothakota, 1997), entre autres, sont toutes substrats des caspases. Le clivage de la gelsoline permet de générer un fragment qui est constitutivement actif (Kothakota, 1997). De plus, ROCK1, une kinase qui peut phosphoryler la chaîne légère de la myosine et modifier la dynamique du cytosquelette d'actine, est également clivée par les caspases en C-terminal et le fragment N-terminal ainsi généré est constitutivement actif. Ceci induit une phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et la contraction de faisceaux d'actine, ce qui pourrait jouer un rôle dans les phénomènes de bourgeonnement (Coleman *et al.*, 2001 ; Sebbagh *et al.*, 2001). Les microtubules sont également affectés par cette protéolyse caspase-dépendante étant donné que plusieurs protéines associées aux microtubules, telle que la dynéine (Lane *et al.*, 2001), sont substrats des caspases. Enfin, certaines protéines qui composent les filaments intermédiaires, telles que la vimentine, les kératines et les lamines nucléaires, sont également cibles des caspases (Morishima, 1999 ; Ku *et al.*, 1997). Concernant les lamines nucléaires, leur protéolyse par les caspases participerait aux phénomènes de condensation et de fragmentation nucléaire (Rao *et al.*, 1996). Ainsi, l'expression de formes de lamines résistantes au clivage par les caspases permet de prévenir la perte de l'intégrité nucléaire et de retarder la fragmentation de l'ADN (Rao *et al.*, 1996). La fragilisation de la lamina nucléaire associée aux modifications du cytosquelette cytoplasmique permettrait les phénomènes de fragmentation. Enfin, des clivages médiés par les caspases de protéines constitutives des points focaux d'adhésion, des jonctions inter-cellulaires et des desmosomes participeraient au phénomène de détachement de la matrice extracellulaire et à la perte de contact entre cellules avoisinantes.

Le clivage de certaines protéines participerait au phénomène de fragmentation des organites. C'est notamment le cas pour p115, dont le produit de clivage C-terminal par les caspases 3 et 8 participerait au phénomène de fragmentation golgienne (Chiu *et al.*, 2002). Plusieurs autres protéines golgiennes, comme GRASP65 ou la giantine, sont également substrats des caspases et leur clivage serait impliqué dans ce phénomène de fragmentation. La mitochondrie subit également un phénomène de fragmentation, mais les caspases n'ont pas

été majoritairement impliquées dans ce phénomène, qui pourrait dépendre des membres Bax et Bak de la famille de Bcl-2 (Karbowski *et al.*, 2006).

1.2.5.3. Autres protéases impliquées dans l'apoptose.

Plusieurs protéases autres que les caspases, dont des sérine protéases, les calpaïnes, les cathepsines ainsi que le protéasome, peuvent être impliquées dans le déclenchement de l'apoptose.

Parmi les sérine protéases pouvant être impliquées dans l'apoptose, les granzymes sont une famille de protéases, contenues dans les granules lytiques de lymphocytes T et des cellules NK et qui peuvent être exocytées pour lyser des cellules à éliminer en association avec la perforine. Granzyme A et B sont les plus abondantes au sein de ces granules lytiques. De façon similaire aux caspases, Granzyme B clive ses substrats après un résidu acide aspartique et peut ainsi cliver et activer plusieurs caspases, telle que la caspase 3, ainsi que la protéine Bid (Martin *et al.*, 1996 ; Barry *et al.*, 2000), induisant ainsi une mort cellulaire par apoptose. Des lymphocytes T cytotoxiques déficients en granzyme B ont ainsi une capacité réduite d'induction de la fragmentation de l'ADN et de l'apoptose de cellules cibles (Heusel *et al.*, 1994).

Les calpaïnes sont une famille de cystéine protéases neutres cytoplasmiques, dont certaines sont ubiquitaires, comme les calpaïnes m et μ , et d'autres tissus-spécifiques. Leur activité est dépendante du taux calcique intracellulaire et elles sont donc activées en réponse à des signaux apoptotiques favorisant des élévations de calcium intracellulaire, notamment ceux induisant un stress du réticulum endoplasmique. De nombreux substrats des calpaïnes sont des protéines des réseaux constituant le cytosquelette et elles pourraient donc jouer un rôle important dans les modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose. Les pro-caspases 7, 9, 10 et 12 sont également substrats des calpaïnes mais, alors que ce clivage est activateur pour les caspases 10 et 7, il semble inhibiteur pour la caspase 9 (Storr *et al.*, 2011). Certains membres de la famille de Bcl-2 peuvent également être clivés par cette famille de protéases, ce qui pourrait moduler leur fonction. Par exemple, le fragment N-terminal de Bax formé après clivage par les calpaïnes, serait actif pour induire le relargage du cytochrome c (Gao & Dou, 2000).

Les cathepsines sont une famille de protéases lysosomales subdivisées en trois groupes, les cathepsines A et G sont des sérine protéases, les cathepsines D et E des acide aspartique protéases et les autres membres sont des cystéine protéases. Elles sont activées par clivage essentiellement au sein du lysosome et sont libérées depuis le lysosome vers le cytosol après perméabilisation du lysosome, phénomène pouvant être induit au cours de l'apoptose. Certaines cathepsines sont capables de cliver Bid en t-Bid qui jouera sa fonction pro-apoptotique classique d'activateur de la voie mitochondriale (Droga-Mazovec *et al.*, 2008). Les cathepsines pourraient également cliver et activer les caspases effectrices 3 et 7.

Le protéasome est également impliqué dans la régulation de l'apoptose. Ainsi, le protéasome participe à la dégradation de molécules anti-apoptotiques dans des cellules apoptotique. Les IAP (pour Inhibitor of Apoptosis Protein) (cf. chapitre I.2.7.1.3), sont des protéines anti-apoptotiques. Il a été mis en évidence que les IAP, qui possèdent un domaine leur conférant une activité E3 ubiquitine ligase, s'auto-ubiquitinylent ce qui entraîne leur dégradation protéasome-dépendante (Yang, 2000).

1.2.6. Les deux types de réponse cellulaire aux ligands de mort : type I et type II.

Le contexte cellulaire ajoute un niveau de complexité pour la compréhension de la signalisation induite par les ligands de mort. En effet, deux grands types de réponses aux ligands de mort ont été décrits dans les cellules sensibles à l'apoptose médiée par les DR, selon plusieurs critères (Barnhart *et al.*, 2003). Ceci a essentiellement été étudié pour la réponse à CD95L mais existerait aussi pour la réponse à TRAIL (Ozören & El-Deiry, 2002). On distingue en effet deux groupes de types cellulaires, les cellules dites de type I (telles que les thymocytes, les lignées cellulaires SKW6.4 et H9) et les cellules de type II (telles que les hépatocytes, les cellules β -pancréatiques, les lignées cellulaires Jurkat et CEM).

La distinction entre les deux grands types de cellules est initialement basée sur la nécessité de l'intervention, ou non, de la voie mitochondriale pour l'induction de mort. Il a ainsi été d'abord décrit que la surexpression de protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, i.e Bcl-2 ou Bcl-XL, permet d'inhiber la mort induite par CD95L dans les cellules de type II, alors que la mort des cellules de type I n'est pas affectée par de telles manipulations. A l'inverse, la surexpression de Bcl-2 n'inhibe pas la mort induite par TRAIL dans les CEM, pourtant considérées comme cellules de type II pour la signalisation de CD95 (Keogh *et al.*,

2000). Il a également été mis en évidence que les thymocytes de souris doublement déficientes pour Bax et Bak sont sensibles à l'apoptose dépendante de CD95 (Lindsten *et al.*, 2000), tandis que des cellules de carcinomes coliques humaines Hct 116 déficientes en Bax résistent à la mort induite par TRAIL (LeBlanc *et al.*, 2002). Comme mentionné précédemment, des cellules de type II Jurkat déficientes en caspase-9 sont partiellement résistantes à la mort induite par CD95L. Ainsi, ces différents travaux suggèrent que les cellules de type II nécessitent l'activation de la voie intrinsèque pour mourir suite à l'activation des DR, contrairement aux cellules de type I. L'importance de la voie mitochondriale pour les cellules de type II a également été suggérée par des études réalisées *in vivo*. En effet, alors que l'injection d'un anti-CD95 agoniste à des souris sauvages induit une apoptose hépatocytaire massive et rapide conduisant à une hépatite fatale, ce phénomène n'est pas observé ou ralenti chez des souris déficientes en Bid ou doubles déficientes pour Bax et Bak, ce qui a ainsi permis de mettre en évidence l'importance de l'activation de la voie mitochondriale dans les hépatocytes qui sont donc des cellules de type II (Yin *et al.*, 1999 ; Wei, 2001). De plus, dans les cellules de type II, contrairement aux cellules de type I, le niveau en XIAP est augmenté suite à la stimulation de CD95. La déficience en XIAP (ou son inhibition) permet de restaurer la sensibilité hépatique à l'apoptose induite par CD95L de souris Bid déficientes (Jost *et al.*, 2009). Il est à noter que l'effet protecteur de la surexpression de Bcl-2 ou de Bcl-XL dans les cellules de type II a été remis en cause par une étude utilisant du CD95L membranaire pour l'induction de mort (Huang *et al.*, 1999).

Les cellules de type I et de type II peuvent aussi être distinguées selon l'efficacité de formation du DISC, suite à la liaison des ligands de mort sur leurs récepteurs. En effet, la formation du DISC dans des cellules de type I est bien plus efficace que dans les cellules de type II. Ceci conduit donc à une activation plus précoce et plus importante de la caspase 8 dans les cellules de type I, ce qui expliquerait alors la nécessité d'une amplification mitochondriale du signal de mort dans les cellules de type II (Scaffidi *et al.*, 1998).

Les cellules de type I et de type II pourraient également être distinguées selon leur réponse à certaines formes de CD95L (Figure 16). Ainsi, la forme sCD95L (S2) est cytotoxique vis-à-vis des cellules de type II, mais pas des cellules de type I (Tanaka *et al.*, 1995). En l'utilisant sur 58 lignées cellulaires tumorales, l'équipe de Marcus Peter a mis en évidence qu'environ la moitié des lignées sensibles à l'apoptose induite par un anti-CD95 agoniste sont de type I, et l'autre moitié, de type II (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2003). De

plus, les lignées de type I expriment préférentiellement des marqueurs mésenchymateux tandis que les cellules de type II expriment préférentiellement des marqueurs épithéiaux. Les auteurs ont ainsi suggéré que les types I et II pourraient ainsi correspondre à différents stades de la carcinogénèse qui met en jeu la transition épithélio-mésenchymateuse (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2003).

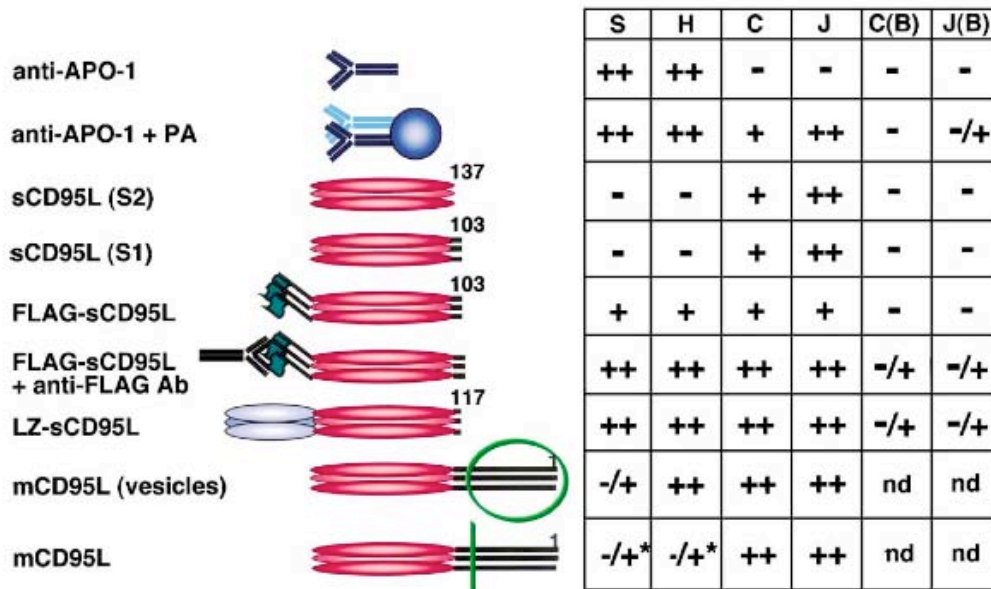


Figure 16. Effet de différentes formes de CD95 sur des cellules de type I ou II. Les cellules SKW6.4 (S) et H9 (H) de type I et les cellules CEM (C) et Jurkat (J) ont été stimulées avec un anti-APO-1 ou différentes formes de CD95L. L'induction d'apoptose est évaluée (de ++, les plus sensibles à -, les moins sensibles ; nd, non déterminé). Les nombres correspondent aux acides aminés de CD95L. C(B), CEM exprimant Bcl-XL ; J(B), Jurkat exprimant Bcl-2 ; PA, protéine A ; sCD95L, CD95L soluble ; mCD95L, CD95L membranaire ; * réponse apoptotique aigue. (Barnhart *et al.*, 2003)

Il a été également suggéré que la nécessité, ou non, de l'internalisation de CD95 pour l'induction de mort est un critère de distinction entre les cellules de type I et II. En effet, l'internalisation dans les cellules de type I permettait le recrutement des composants du DISC et l'induction de la signalisation apoptotique, alors qu'elle n'est pas nécessaire dans les cellules de type II (Lee *et al.*, 2006). De plus, l'induction d'apoptose a été proposée comme dépendant de l'actine dans les cellules de type I, contrairement aux cellules de type II (Algeciras-Schimnich & Peter, 2003). Cependant, l'importance de l'internalisation et de l'implication du cytosquelette d'actine dans l'induction de la signalisation apoptotique médiée par le récepteur CD95 dans les cellules de type I dépendrait du type de ligand utilisé. En effet, comme décrit classiquement, une étude a confirmé que l'anticorps agoniste APO 1-3 induit un signal apoptotique dépendant de l'actine dans les cellules de type I testées (SKW6.4 et

H9), alors que l'induction d'apoptose par cet anticorps ne dépend pas de l'actine dans les cellules de type II (Jurkat et CEM) (Chaigne-Delalande *et al.*, 2009). Contrairement à ce qui est observé avec l'anticorps anti-CD95, l'inhibition pharmacologique de la polymérisation de l'actine n'affecte pas la formation du DISC et l'induction d'apoptose par CD95L soluble dans les cellules de type I et II (Chaigne-Delalande *et al.*, 2009). L'anticorps APO 1-3 induit l'endocytose massive et rapide des récepteurs CD95 dans les cellules de type I, et de façon plus lente et plus réduite dans les cellules de type II, phénomène inhibé par l'incubation de cellules avec des inhibiteurs de la polymérisation de l'actine (Chaigne-Delalande *et al.*, 2009). A l'inverse et quelque soit le type de cellule considéré, aucune internalisation de CD95 n'a été observée avec CD95L (Chaigne-Delalande *et al.*, 2009). Il a également été proposé que les récepteurs CD95 étaient constitutivement localisés au sein des rafts dans les cellules de type I, contrairement aux cellules de type II (Eramo *et al.*, 2004 ; Muppidi & Siegel, 2004).

1.2.7. Mécanismes de régulation de l'apoptose induite par les DR : les inhibiteurs de caspases et l'effet de certaines chimiothérapies.

1.2.7.1. Inhibiteurs des caspases d'origine virale ou cellulaire.

1.2.7.1.1. CrmA, p35 et p49.

Le premier inhibiteur des caspases découvert fut CrmA (pour Cytokine response modifier A), produit par le virus de la vaccine (Ray *et al.*, 1992). CrmA est une serpine, un inhibiteur de sérine protéases, capable d'inhiber l'activité de la caspase-1, la génération d'interleukine 1- β et d'interleukine 18 et la mort induite par la surexpression de la caspase-1. CrmA lie et inactive les caspases, agissant comme un pseudo-substrat. L'inhibition vis-à-vis des caspases initiatrices est irréversible, étant donné que CrmA induit un clivage entre les sous unités p10 et p20 et reste associé de façon covalente avec les sous unités p20 (Dobo *et al.*, 2006). CrmA est également capable d'inhiber la mort induite par CD95L et par le TNF (Tewari & Dixit, 1995). En effet, CrmA inhibe la caspase 8 et la caspase 10, initiatrices dans la signalisation apoptotique dépendante des DR (Garcia-Calvo *et al.*, 1998). Il aurait en revanche peu d'activité vis-à-vis des caspases effectrices et de la caspase 9 *in cellulo*. D'autres inhibiteurs de caspases d'origine virale existent, tels que p35 et p49, protéines codées par des gènes d'un virus qui n'infecte pas les mammifères mais les insectes (Clem *et al.*, 1991). L'expression ectopique de p35 et p49 inhibe les caspases de cellules d'insectes mais aussi de mammifères.

1.2.7.1.2. Les protéines vFLIP et cFLIP.

Le DISC, formé suite à la liaison de ligands de mort sur leurs récepteurs comprend également des composants nommés cFLIP (pour cellular FLICE-inhibitory protein) (Irmeler *et al.*, 1997). Ces composants sont homologues à d'autres protéines, vFLIPs (pour viral FLICE-inhibitory protein) retrouvées chez certains virus et qui inhibent la signalisation apoptotique issue des DR dans les cellules infectées (Thome *et al.*, 1997). On distingue 13 variants d'épissage de cFLIP dont 3 sont traduits en protéines : cFLIPL, cFLIPs et cFLIPR. Ils sont surexprimés dans de nombreux cancers et certains ont mis en évidence une corrélation entre la résistance de certaines cellules cancéreuses vis-à-vis de la mort induite par TRAIL et le niveau d'expression de cFLIPL (Griffith *et al.*, 1998). De plus l'inhibition d'expression de cFLIP par ARN interférence permet de sensibiliser des cellules de mélanome à la mort induite par TRAIL ou CD95L (Geserick *et al.*, 2007). La forme courte, cFLIPs, présente deux DED similaires à ceux des pro-caspases 8 et 10 et est un analogue de vFLIP. La forme longue, cFLIPL, contient en plus un domaine caspase-like dans lequel la cystéine catalytique est remplacée par une tyrosine (Irmeler *et al.*, 1997 ; Inohara *et al.*, 1997). La présence de deux DED sur ces protéines leur permettrait d'interagir avec FADD, d'être recrutées au sein du DISC et ainsi d'entrer en compétition pour le recrutement de la caspase 8 dont l'activation serait ainsi inhibée (Scaffidi *et al.*, 1999 ; Krueger, 2001). Pour la forme courte de cFLIP, ceci semble relativement admis étant donné que cette protéine inhibe l'activation de la caspase 8. A l'inverse, cFLIPL permettrait une activation partielle et locale de la caspase 8 et 10 par hétérodimérisation et son rôle d'inhibiteur de l'apoptose a ainsi été controversé (Chang *et al.*, 2002 ; Micheau, 2002 ; Boatright *et al.*, 2004). La troisième isoforme, cFLIPR jouerait un rôle inhibiteur similaire à celui de cFLIPs (Golks, 2005).

1.2.7.1.3. Les IAPs.

Les IAP (pour Inhibitor of Apoptosis Protein) sont une famille de plusieurs protéines dont huit sont présentes chez les mammifères : NAIP, XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, BRUCE, survivin et livin. Les premiers membres ont été initialement identifiés comme étant des produits du baculovirus pouvant inhiber l'apoptose de cellules infectées par des baculovirus dont le gène codant pour p35 avait été invalidé. D'autres protéines, issues du baculovirus ou d'autres virus, ainsi que plusieurs homologues cellulaires ont ensuite été identifiés chez la levure, la drosophile et les vertébrés. Toutes ces protéines possèdent un à trois motifs BIR (pour Baculoviral IAP Repeats), qui sont des domaines d'interaction protéine-protéine qui

leur confère leur capacité d'inhibiteur de l'apoptose. XIAP, cIAP1 et cIAP2 possèdent, en plus de trois domaines BIR, un domaine carboxy-terminal RING qui leur confère une activité ubiquitine ligase (E3) (Yang, 2000). Ces protéines sont ainsi capables d'ubiquitiner des protéines auxquelles elles se lient, ou de s'auto-ubiquitiner au cours de l'apoptose. XIAP, qui est clivé au cours de l'apoptose, est un inhibiteur direct des caspases 3, 7 et 9 (Deveraux *et al.*, 1997 ; Deveraux *et al.*, 1999), capable de réguler négativement l'apoptose médiée par CD95 (Wilkinson *et al.*, 2004). A l'inverse, le rôle inhibiteur direct de c-IAP1 et 2, qui sont toutefois capables de lier directement les caspases, reste controversé. Grace à leur activité ubiquitine-ligase, XIAP, cIAP1 et cIAP2 sont en revanche toutes trois capables de mono ou poly-ubiquitiner les caspases 3 et 7. Cette ubiquitination pourrait être un moyen de les inactiver et/ou d'induire leur dégradation. De plus, des molécules mimant l'action de Smac, qui inhibent les IAP, sensibilisent les cellules à la mort induite par TRAIL et par le TNF- α (Li, 2004). Un syndrome lymphoprolifératif lié à l'X, se développant en général en réponse à une infection par l'EBV et caractérisé par une lymphohistiocytose et une hypogammaglobulinémie, a été associé à la présence de mutations inactivatrices de XIAP (Rigaud *et al.*, 2006). Cette étude suggère que la déficience en XIAP induirait une baisse drastique du nombre de cellules NKT par augmentation de leur sensibilité à l'apoptose. Etant donné que ces cellules permettent physiologiquement l'élimination des lymphocytes infectés par EBV, ceci participerait à l'apparition du syndrome lymphoprolifératif. Parmi la famille des IAP, la survivine fait l'objet d'un intérêt particulier. En effet, cette protéine, qui possède un domaine BIR, est exprimée au cours du développement embryonnaire, mais n'est pas exprimée dans les tissus sains adultes, et elle peut être réexprimée dans des tissus cancéreux (Ambrosini *et al.*, 1997).

1. 2.7.2. Inhibiteurs chimiques ou synthétiques des caspases.

Contrairement aux pathologies cancéreuses, certaines pathologies, telles que des maladies neuro-dégénératives ou l'infarctus du myocarde, pourraient être liées à des excès d'apoptose. Plusieurs inhibiteurs de caspases, très largement utilisés en recherche fondamentale pour l'étude de la mort cellulaire et/ou de l'inflammation, ont ainsi été synthétisés et pourraient potentiellement, sous une forme modifiée, être utilisés comme traitement de ces pathologies. Ces inhibiteurs sont des peptides qui agissent comme pseudo-substrats. Il s'agit d'inhibiteurs compétitifs possédant au minimum un résidu aspartate souvent précédé par deux ou trois autres résidus qui permettent de cibler de façon plus ou

moins spécifique certaines caspases. La spécificité des inhibiteurs censés inhiber une seule caspase reste ainsi relative (McStay *et al.*, 2008). De plus, certains des inhibiteurs de caspases sont également capables d'inhiber d'autres protéases, telles que certaines cathepsines, et leur simple utilisation ne devrait donc pas permettre de conclure quant à l'implication des caspases dans un phénomène biologique donné. Les peptides utilisés sont couplés à des groupements chimiques divers qui déterminent leur mécanisme d'action et l'irréversibilité de leur liaison aux caspases. Ainsi, les peptides reliés à des groupement fluoro ou chloro méthyl-cétones (-FMK ou -CMK) se lient de façon irréversible alors que les peptides liés à des groupements aldéhydes (-CHO) se lient de façon réversible (Ekert *et al.*, 1999). Ces inhibiteurs semblent être efficaces *in vivo* chez l'animal. Ainsi, l'injection intraveineuse de z-VAD-FMK permet d'inhiber l'action hépatotoxique d'anticorps anti-CD95 chez la souris (Rodriguez *et al.*, 1996). Plusieurs firmes pharmaceutiques développent ainsi des inhibiteurs de caspases non peptidiques ou peptido-mimétiques. Par exemple, l'IDN-6556, un inhibiteur non peptidique irréversible à large spectre des caspases, permet de réduire de façon significative les taux sériques d'alanine aminotransférase et d'aspartate aminotransférase (ALAT et ASAT) chez des patients atteints d'hépatite C (Pockros *et al.*, 2007).

1.2.7.3. Régulation de la mort DR dépendante par la chimiothérapie.

Plusieurs études ont mis en évidence la possibilité de sensibiliser des cellules cancéreuses à la mort médiée par les récepteurs de mort CD95, TRAILR1 ou TRAILR2, en pré-traitant les cellules avec plusieurs types de molécules utilisées en chimiothérapie anticancéreuse. Les mécanismes possibles de cette chimiosensibilisation sont multiples et se situent à plusieurs niveaux de la cascade apoptotique. Ainsi, l'utilisation d'étoposide ou de cisplatine favorise l'apoptose de cellules de gliomes induite par TRAIL *in vitro* et *in vivo*, ce mécanisme étant attribué à une élévation de l'expression de DR5 induite par ces traitements chimiothérapeutiques (Nagane *et al.*, 2000). De nombreuses autres chimiothérapies modulent l'expression des récepteurs de TRAIL, comme évoqué plus haut (cf. chapitre I.2.3.1.4.2.). De façon similaire, plusieurs molécules de chimiothérapie favorisent l'apoptose CD95-dépendante en augmentant l'expression du récepteur CD95 (Micheau *et al.*, 1997). Le cisplatine est également capable de favoriser le regroupement (clustering) de CD95 à la surface de cellules de cancer colique humaines, favorisant l'apoptose médiée par des anticorps agonistes de CD95. Ce phénomène pourrait impliquer le céramide et l'activation d'une sphingomyélinase acide (cf. II.3) (Lacour *et al.*, 2004). La doxorubicine, le 5FU et le

cisplatine sont également capables de sensibiliser des cellules de carcinomes coliques résistantes à la mort induite par TRAIL (Lacour *et al.*, 2001). Cette sensibilisation s'accompagne d'une élévation du recrutement de FADD et de la caspase 8 au niveau du DISC et serait partiellement inhibée par la surexpression de Bcl-2 (Lacour *et al.*, 2003). Il a également été mis en évidence que la chimiosensibilisation de cellules à la mort induite par TRAIL pouvait s'accompagner d'une diminution d'expression de cFLIP (Ganten *et al.*, 2004) ou d'une élévation de l'expression de Bax (LeBlanc *et al.*, 2002). Le pré-traitement par des médicaments anti-cancéreux de cellules cancéreuses surexprimant DcR2, et donc particulièrement résistantes à l'apoptose induite par TRAIL, permet de les resensibiliser à la fois *in vitro* et *in vivo* (Morizot *et al.*, 2010). Dans cette étude, ce phénomène, impliquant essentiellement une élévation de la formation du DISC, ne semble pas mettre en jeu la voie mitochondriale (Morizot *et al.*, 2010).

I.3. Signalisations cytotoxiques caspase-indépendante, émanant des récepteurs de mort.

Au delà de l'induction d'apoptose, des études ont suggéré que les stimuli apoptotiques, dont les ligands des DR, pouvaient, selon le contexte cellulaire considéré, induire d'autres types de mort présentant des caractéristiques morphologiques et biochimiques diverses (Laster *et al.*, 1988). Ainsi, certains ligands de mort induisent la mort cellulaire, même lorsque les caspases sont inactivées par l'utilisation du zVAD-fmk, un inhibiteur à large spectre des caspases, mais également dans des cellules déficientes en caspases. Cette perte de viabilité qui a lieu malgré l'inhibition ou le déficit des caspases, a été qualifiée de mort cellulaire caspase-indépendante. Morphologiquement, elle peut présenter des caractéristiques de nature autophagique, apoptotique ou ressemblant à l'apoptose (apoptosis-like), ou nécrotique. Dans ce dernier cas, on parle alors de nécroptose ou de nécrose régulée, par opposition à la nécrose classique considérée comme un phénomène accidentel. La mort caspase-indépendante serait dépendante de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. En effet, dans certains cas, l'expression de protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 inhibe ce type de mort cellulaire et la résistance à la mort caspase-indépendante pourrait être liée à la persistance de mitochondries intactes (Tait *et al.*, 2010).

L'action de stimuli apoptotiques en présence d'une inhibition des caspases peut induire l'apparition d'une forme de mort présentant des caractéristiques apoptotiques modifiées, telles qu'une condensation chromatiniennne partielle, une fragmentation de l'ADN (non inter-nucléosomale) et la translocation d'AIF de la mitochondrie vers le noyau (Susin *et al.*, 2000). Elle pourrait donc impliquer le relargage de facteurs solubles mitochondriaux dont l'action cytotoxique est caspase-indépendante, tels que AIF ou l'endonucléase G, ou encore de protéases autres que les caspases telles que les cathepsines ou les calpaïnes qui partagent des substrats communs avec les caspases.

La nécroptose peut être médiée par les récepteurs de mort TNFR1, TRAILR1, TRAILR2 et CD95 et certaines protéines initiant ce phénomène sont connues. En effet, l'initiation de la nécroptose nécessite l'intégrité et l'activité des kinases RIP1 et/ou RIP3 qui peuvent interagir fonctionnellement et physiquement. Ainsi, l'équipe de Jürg Tschopp a mis en évidence en 2000 que la stimulation de CD95 pouvait initier une mort caspase indépendante, et en particulier caspase-8 indépendante, nécessitant à la fois la présence de FADD et de RIP1 catalytiquement actif (Holler *et al.*, 2000). Les cellules présentent alors certains changements morphologiques nécrotiques (Holler *et al.*, 2000). La même étude a mis en évidence que RIP1 est également nécessaire pour la mort nécrotique induite par le TNF et TRAIL (Holler *et al.*, 2000). La sérine thréonine kinase RIP3 serait nécessaire pour l'induction de mort par le TNF en présence d'inhibiteur de caspase (Zhang *et al.*, 2009). En effet, dans des cellules sensibles à l'apoptose induite par le TNF, la présence d'inhibiteur de caspases permet un switch de la mort apoptotique dépendante de la caspase 8 vers une mort nécroptotique impliquant le recrutement de RIP3 par RIP1 pour former un complexe inducteur de nécrose, baptisé le nécrosome, constitué de RIP1 et RIP3 (He *et al.*, 2009). La formation de ce complexe peut être inhibée par les nécrostatines, des inhibiteurs de RIP1 (He *et al.*, 2009). La caspase-8 est capable de cliver RIP1 et 3 et pourrait ainsi inhiber leur rôle dans la nécroptose. De façon intéressante, il a été mis en évidence que la perte des cIAPs sensibilise les cellules à la mort induite par CD95L et que cette mort ne peut être inhibée que par la présence conjointe d'inhibiteurs des caspases et de RIP1 (Geserick *et al.*, 2009). Récemment, trois équipes en parallèle ont généré des modèles murins doubles déficients en un composant du DISC et un composant du nécrosome, soit des modèles doubles KO caspase 8 RIP3 ou FADD RIP1 (Kaiser *et al.*, 2011 ; Oberst *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2011). Ces trois études ont permis de mettre en évidence que la déficience en un des composants du nécrosome permet d'empêcher la létalité embryonnaire normalement observée chez les

animaux déficients en FADD ou en caspase 8. Ainsi, la signalisation caspase-dépendante inhibe la signalisation caspase-indépendante, prévenant les effets délétères de cette dernière au cours du développement (Figure 17).

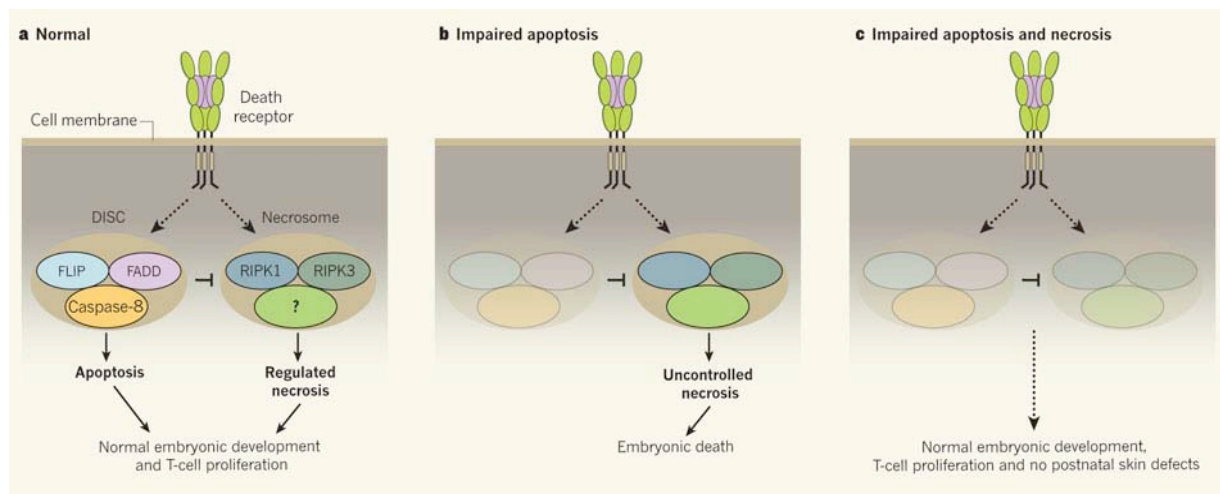


Figure 17 Modèles des relations fonctionnelles possibles entre le DISC et le nécrosome. A : Chez les souris normales, il existe une balance entre la nécrose et l'apoptose qui dépend notamment de la capacité de composant du DISC à cliver les composant du nécrosome. **B :** La déficience d'un des composants du DISC (FADD, caspase 8 ou FLIP) conduit à une nécrose non contrôlée et à une mort embryonnaire. **C :** La double déficience en un des trois composants du DISC et de RIP1 ou RIP3 prévient la létalité embryonnaire. Toutefois, les souris doubles déficientes en FADD et RIP1 meurent peu de temps après la naissance et les doubles déficientes en caspase 8 et RIP3 développent un syndrome lymphoprolifératif du à un défaut d'apoptose récepteur médiée (Peter, 2011).

Les mécanismes impliqués en aval du nécrosome restent peu connus. Les étapes suivantes de la nécroptose pourraient impliquer la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène). L'équipe de Peter Vandanabeele a montré que, *in vitro*, dans certains cas, l'utilisation d'inhibiteurs de caspases a un effet sensibilisateur vis-à-vis de la nécrose induite par le TNF (Vercammen *et al.*, 1998a) et induit une mort de type nécrotique CD95-médiée (Vercammen *et al.*, 1998b) et ces deux phénomènes sont dépendant de la production de ROS. Une équipe japonaise a également confirmé que seule l'association d'anti-oxydants et de zVAD-fmk permettait d'inhiber totalement la perte de viabilité dépendante de CD95 (Matsumura *et al.*, 2000). *In vivo*, il a également été observé que l'injection de zVAD-fmk augmente l'accumulation de ROS, qui serait dépendante de la PLA2 (phospholipase A2), et la toxicité induite par le TNF (Cauwels *et al.*, 2003). Une étude a suggéré que RIP1, TRAF2 et FADD seraient impliqués dans la production de ROS observée au cours de la nécroptose induite par le TNF (Lin, 2003). Une autre étude a mis en évidence que le TNF induit une activation de la NADPH oxydase 1 qui jouerait un rôle dans la production de ROS observée au cours de la

nécroptose (Kim *et al.*, 2007). La nécroptose met également en jeu la perméabilisation des membranes mitochondriales, lysosomales et plasmique. Il a notamment été mis en évidence que la surexpression de Bcl-2 rend les cellules résistantes à la nécroptose induite par le TNF (Thon *et al.*, 2005). Le céramide serait également impliqué dans la nécroptose induite par TRAIL ou par le TNF (Thon *et al.*, 2006 ; Thon *et al.*, 2005) (cf. chapitre II.3.2.1).

Une étude a également mis en évidence l'activation de RIP1 et de JNK au cours de la mort caspase-indépendante induite par une inhibition de la caspase 8 (Yu, 2004). Les cellules présentent dans cette étude des signes d'autophagie et la mort cellulaire nécessite les gènes ATG7 et beclin 1 (Yu, 2004).

I.4. Autres rôles et signalisations, non cytotoxiques, mises en jeux par les DR.

Les DR peuvent non seulement induire la mort cellulaire en réponse à leur ligand mais peuvent également être à l'origine de signalisations non apoptotiques en faveur de la prolifération ou de la différenciation cellulaire. Ceci a été largement décrit pour le TNF- α et plusieurs études indiquent que ceci serait également le cas pour CD95L et TRAIL. En effet, dans la majorité des cas, la liaison du TNF sur le TNFR1 favorise le recrutement de la protéine TRAF2 (pour TNF Receptor-Associated Factor 2) par TRADD. TRAF2 est capable d'induire l'activation de plusieurs cascades de signalisation conduisant en particulier à l'activation de JNK (Jun-kinase) et de p38, capables d'activer AP-1, un facteur de transcription qui contrôle l'expression de nombreux gènes, notamment de facteurs de croissance et de médiateurs de l'inflammation. TRAF2 est également capable de recruter RIP1 qui peut notamment favoriser l'activation de la MAPK (Mitogen-Activating protein kinase) MEKK3 qui conduit à l'activation de NEMO (ou IKK γ) et, *in fine*, à l'activation du facteur de transcription NF κ B. L'activation de NF κ B induit notamment l'expression de certaines protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-XL, c-FLIP, c-IAP-1 et c-IAP2 et XIAP et de protéines pro-inflammatoires (cytokines et molécules d'adhésion).

I.4.1. Autres rôles et signalisations médiées par les récepteurs de TRAIL.

Plusieurs études ont mis en évidence que les récepteurs de mort de TRAIL jouaient également des rôles non cytotoxiques, de régulation de la prolifération cellulaire de cellules saines ou tumorales, et de la régénération tissulaire. La liaison de TRAIL peut, dans certaines

cellules, induire l'activation de voies de signalisations impliquant NFκB, PI3K, JNK ainsi que les MAPK. L'activation de ces voies pourrait jouer en faveur de la survie et de la prolifération cellulaire. Dès la découverte des récepteurs DR4 et DR5, il a ainsi été observé que leur surexpression pouvait en effet activer NFκB et que TRAIL, à forte dose, pouvait également induire cette activation, *via* DR4, DR5 mais aussi DcR2 (Sheridan, 1997 ; Degli-Esposti *et al.*, 1997a ; Schneider *et al.*, 1997). De façon remarquable, une étude sur 18 lignées de cellules tumorales et 53 échantillons de cellules leucémiques primaires, a permis de mettre en évidence que plus de 20% des cellules testées répondaient à TRAIL en proliférant et que l'expression de dominant négatif de FADD ou la perte d'expression de la caspase 8 convertissaient des cellules normalement sensibles à l'apoptose induite par TRAIL en cellules proliférant en réponse à TRAIL (Baader *et al.*, 2005). Ce phénomène est dépendant de RIP1 et de l'activation de NFκB (Baader *et al.*, 2005 ; Ehrhardt *et al.*, 2003). Ce type d'étude suggère également qu'il serait judicieux de privilégier des thérapies combinées d'agonistes des TRAILRs et d'agents sensibilisateurs, chimiothérapeutiques par exemple, permettant de passer outre ce type de résistance (cf. chapitre I.5.). Il a également été mis en évidence que TRAIL pouvait favoriser la prolifération de cellules humaines endothéliales du cordon ombilical *via* l'activation de PI3K qui active la sérine/thréonine kinase PKB/Akt et *via* l'activation de ERK1/2 (Secchiero, 2003). TRAIL peut également activer ERK1/2 dans des cellules de mélanome, voie de signalisation qui contrecarre dans ce cas son effet apoptotique (Zhang *et al.*, 2003). Le rôle de ERK1/2 dans la signalisation induite par TRAIL reste toutefois controversé.

TRAIL pourrait également augmenter le pouvoir invasif et métastatique de cellules tumorales résistantes. Ainsi, TRAIL favorise la migration et l'invasion de cellules de cholangiocarcinome résistantes à l'apoptose induite par TRAIL, de façon NFκB dépendante (Ishimura *et al.*, 2006). De plus, l'injection intra-péritonéale de TRAIL augmente significativement le nombre et le volume de métastases hépatiques de cellules d'adénocarcinome pancréatique humaines implantées dans le pancréas de souris immunodéficientes (Trauzold *et al.*, 2006). En plus du DISC, TRAIL peut également induire la formation plus tardive d'un complexe de signalisation nommé complexe II, comprenant TRADD, FADD, la caspase 8, la caspase 10, RIP1, TRAF2 et NEMO, qui permettrait l'activation de JNK, p38 et de IKK et potentiellement certains des rôles décrits ci-dessus (Varfolomeev, 2005 ; Jin & El-Deiry, 2006). Au delà de l'induction de gènes anti-

apoptotiques qui pourrait expliquer l'effet inhibiteur de l'activation de NFκB sur l'apoptose induite par TRAIL, NFκB pourrait également participer à promouvoir le recrutement de cellules phagocytaires *via* sa capacité à induire l'expression de chimiokines comme l'IL-8 ou MCP-1 (Varfolomeev, 2005).

1.4.2. Autres rôles et signalisations médiées par CD95.

Dans certaines cellules et tissus et dans certaines circonstances, CD95 ne favorise pas l'apoptose mais la prolifération cellulaire, la migration cellulaire ou la génération de cytokines. Plusieurs études ont mis en évidence que la stimulation de cellules, tumorales ou non, résistantes à l'apoptose médiée par CD95 active des voies de signalisation non apoptotiques, mettant notamment en jeu l'activation de ERK1/2 et de NFκB (Qin *et al.*, 2002 ; Barnhart *et al.*, 2004 ; Ahn, 2001). Le groupe de Marcus Peter a mis en évidence que l'induction d'apoptose nécessitait deux allèles fonctionnels de CD95, tandis que NFκB pouvait être activé dans des cellules ne présentant qu'un seul allèle fonctionnel de CD95 (Legembre *et al.*, 2004). La mutation d'un des deux allèles de CD95, qui est parfois retrouvée dans les cellules tumorales, pourrait donc permettre de changer le signal classiquement pro-apoptotique médiée par CD95, en signal de survie cellulaire. Ceci pourrait également expliquer, en partie, pourquoi une faible stimulation de CD95 induit initialement un signal de survie cellulaire (Lavrik *et al.*, 2007). De façon intéressante, la stimulation de CD95 favoriserait la prolifération des cellules T activées et jouerait un rôle de molécule de co-stimulation (Alderson *et al.*, 1993 ; Kennedy *et al.*, 1999). L'existence d'une signalisation « reverse » dans laquelle CD95 jouerait le rôle de ligand pour la forme membranaire de CD95L a été proposée. Une étude indique ainsi que l'activation de CD95L exprimé par les cellules T activées, associé à la stimulation antigénique de leur TCR favorise leur prolifération (Sun *et al.*, 2006). Il a également été mis en évidence que la stimulation de CD95 pouvait induire la croissance de neurites *in vitro* et accélérer la récupération fonctionnelle après une atteinte nerveuse chez la souris (Desbarats *et al.*, 2003). Au niveau hépatique, alors que, comme décrit précédemment, l'injection d'anticorps agonistes anti-CD95 chez des souris sauvage est hépatotoxique, la stimulation de CD95 par un anticorps agoniste est au contraire bénéfique pour la régénération hépatique après hépatectomie partielle, suggérant que CD95 peut également stimuler des voies en faveur de la prolifération cellulaire dans ce contexte particulier (Desbarats & Newell, 2000). Comme mentionné précédemment, l'inhibition de

l'internalisation dans de cellules de type I s'accompagne de l'activation de ERK et NFκB (Lee *et al.*, 2006). De plus, le traitement de cellules avec un anticorps anti-CD95 qui n'induit pas l'internalisation du récepteur, induit une activation de ERK et de NFκB augmentant leur motilité et leur capacité d'invasion (Lee *et al.*, 2006).

Le groupe de Marcus Peter a également mis en évidence que dans des cellules tumorales résistantes à l'apoptose CD95-médiée, la liaison de CD95L induisait une augmentation de leur motilité et de leur capacité invasive, *via* l'activation de NFκB, ERK1/2 et de la caspase 8 (Barnhart *et al.*, 2004). De plus, l'expression de nombreux gènes est augmentée dans ces conditions dont l'urokinase, ou activateur du plasminogène, une protéase favorisant l'invasion tumorale (Barnhart *et al.*, 2004). Un groupe néerlandais a également mis en évidence que la stimulation de CD95 de cellules de cancer colorectal, induit l'activation d'une phospholipase C-γ1 par le PDGFR-β, dont la stimulation est CD95 dépendante, par un mécanisme indéterminé. Ceci résulterait en une hydrolyse de PIP2, permettant le relargage de la cofilline qui remodèle le cytosquelette d'actine, conduisant à la formation de protrusions membranaires et à l'invasion cellulaire (Steller *et al.*, 2011). Le groupe de Patrick Legembre a récemment mis en évidence, dans différents types cellulaires dont des lymphocytes T activés, que la forme soluble de CD95L n'induit pas la mort cellulaire contrairement à ce qui est observé avec du CD95L membranaire, mais favorise la formation de pseudopodes migratoires comportant à leur extrémité des regroupements (caps) de récepteur CD95 au sein des radeaux lipidiques, ce qui favorise la migration cellulaire. Cette étude propose que la migration soit liée à la formation d'un complexe protéique, comprenant le récepteur CD95 et la kinase c-Yes, baptisé MISC pour « Motility-Inducing Signalling Complex ». Ceci permet la mise en jeu d'une voie de signalisation impliquant Orai1, une élévation intracellulaire de calcium (plus spécifiquement localisée au niveau du pseudopode) et l'activation de PI3K conduisant à l'effet pro-migratoire de CD95L soluble. Enfin, comme mentionné précédemment, l'effet de l'engagement de CD95 pourrait dépendre de la forme de CD95L. Ainsi, seule la forme membranaire de CD95L semble essentielle pour sa fonction cytotoxique, anti-tumorigène et de prévention des lymphadénopathies et de l'autoimmunité, tandis que la forme soluble aurait plutôt un effet favorisant l'auto-immunité et la tumorigénèse (O' Reilly *et al.*, 2009). Une étude récente a mis en évidence que la croissance de plusieurs types de cellules cancéreuses nécessite une activation autocrine de CD95 et que la perte du récepteur CD95, dans des modèles murins de cancers du foie ou de l'ovaire, induit une diminution de l'apparition et de

la croissance des tumeurs chez la souris (Chen *et al.*, 2010). Cet effet tumorigène de CD95 a été proposé comme étant dépendant de JNK (Chen *et al.*, 2010).

I.5. Potentiel thérapeutique de l'utilisation d'agonistes des DR en cancérologie.

La potentielle utilisation thérapeutique d'agonistes du récepteur CD95 en thérapie anticancéreuse a été rapidement freinée par l'observation initiale que l'utilisation de CD95L, ou d'anticorps agonistes anti-CD95, s'accompagne d'une hépatite fulminante chez la souris (Ogasawara *et al.*, 1993 ; Huang *et al.*, 1999). Comme alternative à l'utilisation d'agonistes, plusieurs groupes ont testé *in vitro* et chez la souris, une stratégie de thérapie génique permettant l'expression de CD95L et ont obtenu des résultats prometteurs. Par exemple, l'injection de vecteurs adénoviraux permettant l'expression de CD95L dans les cellules tumorales induit une régression de tumeurs de carcinome colique chez la souris (Arai *et al.*, 1997). Toutefois, ceci n'a à ce jour abouti à aucun essai clinique. Seul l'APO010, ou Mega-FasLigand, un CD95L humain formé de 3 domaines extra-cellulaires de CD95L associés en dimères, qui présente un effet hépatotoxique réversible, est en cours d'essai clinique de phase I chez des patients souffrant de cancers solides.

Alors que l'utilisation de CD95L ou d'anticorps agonistes a été associée à d'importants effets toxiques, l'utilisation d'analogues de TRAIL, *a priori* moins toxiques sur les cellules saines, semble plus envisageable en thérapie anti-cancéreuse. Dès la fin des années 1990, plusieurs groupes ont mis en évidence *in vivo* cet intérêt potentiel d'agonistes des récepteurs de TRAIL en thérapie anti-cancéreuse, en monothérapie ou en association à diverses molécules. Concernant l'innocuité de TRAIL, une étude a d'abord mis en évidence que des injections intraveineuses répétées de TRAIL à des singes ne sont pas toxiques. De plus, l'injection intra-péritonéale ou intra-tumorale de TRAIL à des souris Nude xénogreffées avec des cellules cancéreuses coliques humaines, permet de réduire l'établissement et la progression tumorale et augmente la survie des animaux (Ashkenazi *et al.*, 1999). Plusieurs types d'agonistes aux récepteurs de TRAIL ont été générés : du TRAIL recombinant humain, rhTRAIL, mais également des constructions qui favorisent son oligomérisation, comme les TRAIL étiquetés FLAG ou Histidine (FLAG-TRAIL et His-TRAIL) ainsi que leucine zipper et isoleucine zipper (TRAIL (LZ)-TRAIL et (IZ)-TRAIL). Des groupes ont également généré des anticorps agonistes dirigés contre les récepteurs TRAILR1 ou R2, dont la toxicité pourrait

s'exercer sur des cellules cancéreuses malgré l'expression éventuelle de récepteurs leurres. Plusieurs études laissent penser que l'utilisation de certaines formes de TRAIL pourrait induire une hépatotoxicité et ont ainsi remis en cause leur utilisation potentielle en clinique. Ainsi, His-TRAIL induit l'apoptose d'hépatocytes humains en culture (Jo *et al.*, 2000). Certaines études ont suggéré que LZ-TRAIL et rhTRAIL, efficaces pour diminuer la progression tumorale, ne semblent pas avoir d'effet hépatotoxique *in vivo* (Ashkenazi *et al.*, 1999 ; Walczak *et al.*, 1999 ; Lawrence *et al.*, 2001). Toutefois, une étude a mis en évidence que LZ-TRAIL, IZ-TRAIL et FLAG-TRAIL sont toxiques vis-a-vis d'hépatocytes fraîchement isolés. Cet effet cytotoxique semble dépendre du nombre de passages effectués sur les hépatocytes primaires en culture. Seul le TRAIL recombinant non étiqueté n'a pas d'effet cytotoxique même sur des hépatocytes fraîchement isolés (Ganten *et al.*, 2006). Une étude de phase I, réalisée sur 71 patients souffrant de différents types de cancers avancés, a mis en évidence que l'administration intraveineuse répétée de doses croissantes de TRAIL recombinant humain non étiqueté est relativement bien toléré, mais ne permet généralement qu'une stabilisation de la maladie (Herbst *et al.*, 2010). Certains groupes ont également généré des anticorps agonistes des récepteurs TRAILR1 ou R2, qui présentent une demi-vie augmentée en comparaison au TRAIL recombinant. Ces anticorps semblent être efficaces et peu toxiques chez la souris. Par exemple, l'utilisation d'un anticorps agoniste monoclonal spécifique anti-TRAILR-2 (TRA-8) permet de diminuer la croissance de différentes tumeurs sans induire d'effet hépatotoxique, contrairement au FLAG-TRAIL utilisé en comparaison dans cette étude (Ichikawa *et al.*, 2001). Plusieurs anticorps anti-TRAILR humains ont été générés, la plupart ciblant TRAILR2 et un, le mapatumumab, ciblant TRAILR1. Un essai de phase I de monothérapie avec du lexatumumab, qui cible TRAILR2, a été réalisé permettant d'observer que cet anticorps est bien toléré, permet une stabilisation durable de la maladie chez un tiers des patients mais aucune réponse partielle (Plummer *et al.*, 2007). Le même type d'observations, c'est-à-dire une bonne tolérance mais une efficacité limitée, a été réalisé suite à plusieurs essais cliniques utilisant des anticorps agonistes en monothérapie. D'autres essais associant anticorps agonistes, ou TRAIL recombinant, et chimiothérapie ont alors été menés pour tenter d'améliorer l'efficacité anti-tumorale du traitement.

L'induction d'apoptose par TRAIL, tout comme ce qui est observé pour des molécules de chimiothérapie ou CD95L, est variable selon la lignée cellulaire concernée comme mentionné ci-dessus, mais également au sein de populations cellulaires. Cette variabilité pourrait à la fois être la résultante de variations génétiques des différents composants de la

signalisation apoptotique mais également d'une variabilité épigénétique qui semble être particulièrement importante (Spencer *et al.*, 2009). Ainsi, l'utilisation d'agonistes des récepteurs de TRAIL, en association avec des molécules de chimiothérapies, décrites comme pouvant moduler le niveau et l'activation de certains de ces composants, pourrait également être une solution prometteuse pour espérer éviter toute maladie résiduelle. *In vitro*, de nombreuses études ont mis en évidence que le potentiel cytotoxique de TRAIL peut être augmenté par le pré-traitement ou le co-traitement avec des molécules de chimiothérapie, qui, non seulement activent la voie mitochondriale, mais aussi régule l'expression des récepteurs de TRAIL et de molécules de signalisation telle que FLIP (cf. chapitre I.2.7.3). Ainsi, certains groupes ont testé *in vivo* chez la souris ce type d'association. Une étude a, par exemple, mis en évidence l'effet synergique anti-tumoral de l'utilisation d'association 5FU-TRAIL ou CPT-11, un inhibiteur de la topoisomérase I, TRAIL (Ashkenazi *et al.*, 1999). Une autre étude a mis en évidence que des injections répétées de LZ TRAIL permettaient de supprimer la croissance de tumeurs d'adénocarcinomes mammaires humains xénogreffées chez des souris SCID (Walczak *et al.*, 1999). Cet effet s'accompagne au niveau microscopique de zones de nécrose apoptotique, au niveau tumoral, observées dans les 9-12 heures suivant l'injection (Walczak *et al.*, 1999). Chez l'homme, des essais cliniques utilisant des associations d'anticorps agonistes des TRAILs ou de rhTRAIL avec différentes chimiothérapies ont été débutées. Un essai de phase I, associant mapatumumab (anti-TRAIL-R1) paclitaxel et carboplatine, mené chez 21 patients souffrant de divers cancers solides a permis d'observer une bonne tolérance du traitement menant à une réponse partielle chez 5 patients et une stabilisation de la maladie chez 12 patients (Leong *et al.*, 2009). Il a également été testé l'effet d'une association rhTRAIL, paclitaxel, carboplatine et bevacizumab chez 24 patients atteints de cancers du poumons non à petites cellules à des stades avancés (Soria *et al.*, 2010). Les auteurs ont observé que ce traitement était bien toléré et avait permis d'obtenir une réponse complète chez un des patients et 13 réponses partielles (Soria *et al.*, 2010). Cette association est maintenant en cours d'étude de phase II. Les thérapies combinées d'agonistes de TRAILs avec des molécules chimiothérapeutiques pour le traitement de pathologies cancéreuses semblent donc prometteuses.

II. Les sphingolipides.

Les lipides sont des constituants essentiels des membranes cellulaires. Parmi eux, les sphingolipides sont des composants ubiquitaires des membranes des cellules eucaryotes. Ils sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi, mais sont particulièrement abondants dans la membrane plasmique et les endosomes. Ils constitueraient environ de 20 à 35 % des molécules de lipides de la membrane plasmique (van Meer, 2002). Ils furent initialement identifiés en 1884 par un biochimiste allemand, Johann Ludwig Wilhelm Thudichum, qui a mis en évidence la présence dans des tissus cérébraux de plusieurs lipides tels que la sphingomyéline, dont l'hydrolyse conduit à la formation d'un composé qu'il nomma la sphingosine, en hommage au sphinx de la mythologie grecque. Ces lipides à la fonction énigmatique, tous dérivés de la sphingosine, furent ainsi nommés sphingolipides. Initialement considérés comme de simples éléments de structure des membranes cellulaires, de multiples études attribuent maintenant le rôle d'organiseurs de domaines membranaires particuliers ainsi que de messagers de signalisation cellulaire à plusieurs de ces lipides, dont les taux sont temporellement et spatialement très finement régulés.

II.1. Structure et métabolisme.

II.1.1. Structure des sphingolipides.

Les sphingolipides constituent une classe particulière de lipides contenant une base sphingoïde, un aminoalcool à longue chaîne carbonée (18 ou 20 atomes de carbone). Chez les mammifères, cette base est classiquement la sphingosine, insaturée, la sphinganine (dihydrosphingosine) ou, plus minoritaire, la phytosphingosine (4-hydroxysphinganine), ces deux dernières étant saturées. Sur cette base sphingoïde, la fixation d'un acide gras - choisi parmi plus de 20 espèces différentes en terme de longueur, de degré d'insaturation ou d'hydroxylation - sur le carbone 2 *via* une liaison amide permet d'obtenir le céramide, sphingolipide simple et chef de file des sphingolipides biologiquement actifs (Figure 18).

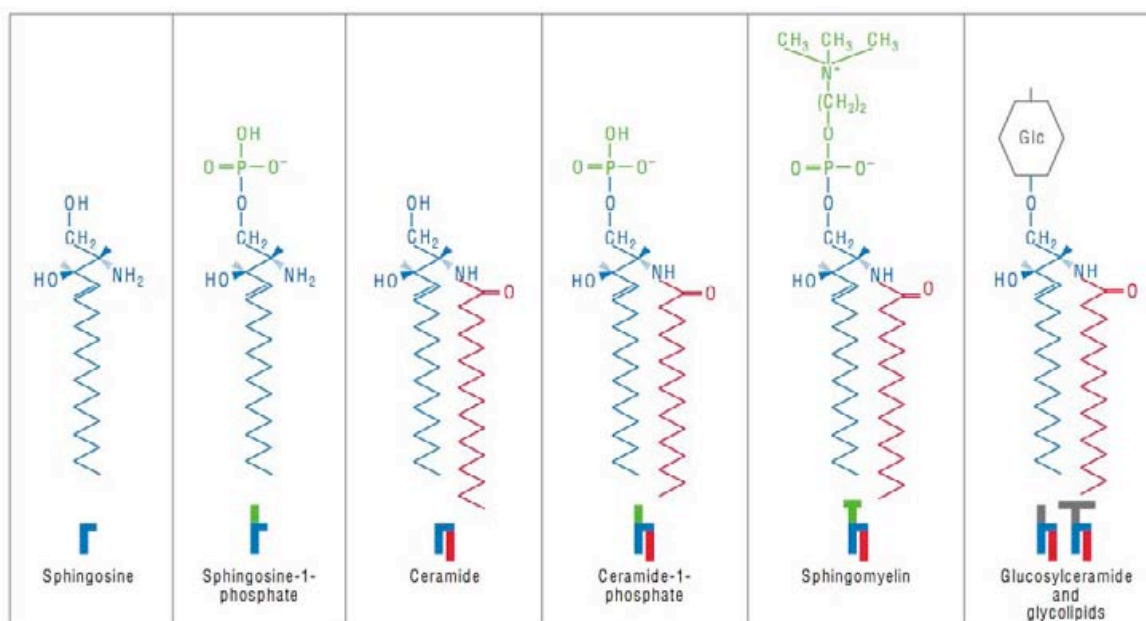


Figure 18. Structure générale des sphingolipides. La base sphingoïde, ici la sphingosine est représentée en bleu. Seules les espèces comportant un acide palmitique (en rouge) sont représentées mais plus de 20 acides gras différents peuvent être liés sur la base sphingoïde. Les groupements hydrophiles (phosphate ou phosphorylcholine) sont représentés en vert. Les glycosphingolipides, tels que le glucosylcéramide, constituent une classe regroupant de plus de 500 espèces différentes (Futerman & Hannun, 2004).

La liaison de groupements polaires au groupement hydroxyl sur le carbone 1 du céramide permet l'obtention de sphingolipides plus complexes. La nature de ces groupements définit le sphingolipide formé. Ainsi, l'addition d'un groupement phosphorylcholine conduit à l'obtention de la sphingomyéline, celle d'un groupement phosphate permet l'obtention de céramide-1-phosphate et celles d'un glucose ou d'un galactose permettent respectivement l'obtention de GlcCer (glucosylcéramide) et de GalCer (galactosylcéramide) (Figure 18). L'ajout de groupements sucrés sur le GlcCer et le GalCer aboutit ensuite à la formation des glycosphingolipides plus complexes. Les gangliosides, classe regroupant plusieurs centaines de membres, sont formés *via* l'ajout d'un ou plusieurs acides sialiques (et parfois d'un groupement GalNAc (N-acétylgalactosamine) principalement sur le lactosylcéramide). Les combinaisons possibles entre les différents éléments constituant les sphingolipides sont donc très nombreuses et leur métabolisme complexe nécessite une régulation fine.

II.1.2. Métabolisme et localisation des enzymes du métabolisme sphingolipidique.

Dans ce chapitre, les principales réactions du métabolisme sphingolipidique (Figure 19) ainsi que la localisation des enzymes qui en sont responsables (Figure 20) seront présentées.

II.1.2.1. Anabolisme des sphingolipides.

La synthèse de sphingolipides débute par la formation d'une base sphingoïde puis du céramide. La première étape de cette synthèse *de novo* de céramide consiste en une condensation d'un palmitoyl-coA (coenzyme A) et d'une L-sérine pour générer la 3-céto-sphinganine. Cette réaction, qui s'accompagne d'une libération de coA et de CO₂, est catalysée par la SPT (Sérine Palmitoyl Transférase), une enzyme localisée au niveau du RE et dont le site actif est cytosolique (Merrill, 2002). Cette enzyme est composée de deux, voire trois, sous-unités, SPT1, SPT2, SPT3, produits de trois gènes distincts. La SPT est l'enzyme limitante pour la synthèse *de novo* de céramide et sa mutation, ou son inhibition pharmacologique, par la myriocine par exemple, peut inhiber la croissance et diminuer la viabilité cellulaire (Nagiec *et al.*, 1994 ; Hanada *et al.*, 1992 ; Hanada *et al.*, 2000). Elle est positivement régulée au niveau transcriptionnel ou post-traductionnel, notamment en réponse à certaines cytokines ou au cours de l'apoptose induite par des agents génotoxiques comme l'étoposide, participant à l'accumulation de céramide observée en réponse à cet agent (Memon *et al.*, 1998 ; Perry *et al.*, 2000). La 3-céto-sphinganine est ensuite rapidement réduite, de manière NADPH dépendante, en sphinganine par la 3-céto-sphinganine réductase, une enzyme également située au sein de la membrane du RE, dont le site catalytique est cytosolique. La sphinganine ainsi générée est ensuite acylée sur le groupement amine en C2 pour former du dihydrocéramide. Cette réaction est catalysée par les CerS (pour (dihydro) céramide synthases), dont il existe 6 gènes chez l'homme, de *LASS 1* à *6* (pour Longevity ASSurance), enzymes du RE possédant plusieurs domaines transmembranaires. Ces enzymes peuvent être inhibées pharmacologiquement par la fumonisine B1. Les acides gras ajoutés sont divers, en terme de longueur (de 14 à 32 carbones), de degré d'hydroxylation et d'insaturation. Il semblerait que chacune des LASS soit spécifique de certains acides gras en particulier. Par exemple, la CerS1 possède une préférence pour les acides gras C18:0. La

CerS2 utilise préférentiellement des acides gras de 20 à 26 carbones (Laviad *et al.*, 2007). L'expression des CerS varie selon les tissus et elle est corrélée à la proportion des différentes espèces de céramide retrouvée dans ces tissus (Laviad *et al.*, 2007). Les céramides peuvent également être générés par les LASS à partir de sphingosine issue de la dégradation de sphingolipides complexes ; c'est ce que l'on appelle la voie de recyclage. De plus, les céramidases peuvent catalyser la synthèse de céramide à partir de la sphingosine par leur activité « reverse » (El Bawab, 2001 ; Mao *et al.*, 2000) (cf. chapitre II.1.2.2). La dernière étape conduisant à la génération de céramide consiste en la formation d'une double liaison trans-4,5, réaction catalysée par la dihydrocéramide désaturase, une enzyme à trois domaines transmembranaires dont l'activité catalytique est dépendante du NADPH (Geeraert *et al.*, 1997 ; Ternes, 2002). Cette conversion a également lieu au niveau du feuillet cytosolique du RE. Il a été proposé que la présence de cette double liaison joue un rôle essentiel dans le potentiel pro-apoptotique du céramide (cf. chapitre II.3.2) (Bielawska *et al.*, 1993).

Une fois formé dans le RE, le céramide peut être métabolisé en divers sphingolipides par ajout de différents groupements polaires. Au sein du RE, au niveau du feuillet luminal, il peut être converti en GalCer par une UDP-galactose : ceramide galactosyltransferase (GalCer transférase I ou GalCer synthase), enzyme transmembranaire de type I qui possède un domaine N-terminal ainsi qu'un site catalytique localisé dans la lumière du RE (Sprong *et al.*, 1998). Tous les tissus n'expriment pas la galactosylcéramide transférase : elle est essentiellement exprimée dans les cellules de Schwann, les oligodendrocytes, le rein, les testicules et les intestins. La gaine de myéline est particulièrement enrichie en galactosylcéramide et ce lipide joue ainsi un rôle fonctionnel important dans le système nerveux. Alternativement, dans le RE également, le céramide peut être converti en CPE (céramide-phosphoéthanolamine) par la SMSr (pour Sphingomyelin Synthase Related). Bien que le CPE soit un sphingolipide uniquement présent à l'état de traces dans les cellules de mammifères, l'activité de la SMSr jouerait un rôle primordial dans le contrôle de l'homéostasie du céramide dans le RE (Vacaru *et al.*, 2009) (cf. chapitre II.4). Le céramide peut également être transféré vers l'appareil de Golgi pour y subir des modifications supplémentaires afin de former la SM (sphingomyéline) et les différents GSLs (glycosphingolipides). Ce transfert peut avoir lieu de différentes façons et plusieurs modèles existent quant au transport du céramide et des sphingolipides entre le RE et l'appareil de Golgi, puis au sein des différentes parties de l'appareil de Golgi. Il a initialement été mis en évidence que le transport du céramide du RE vers l'appareil de Golgi est ATP-dépendant pour

le céramide destiné à la synthèse de SM tandis que la synthèse de GSLs n'est pas affectée par une déplétion en ATP, suggérant que le transport des précurseurs de ces différents lipides est probablement dépendant de mécanismes différents (Fukasawa *et al.*, 1999). En 2000, Kentaro Hanada et ses collaborateurs ont découvert CERT (pour CERamide Transport), une protéine qui possède : (i) un motif FFAT qui lui permet d'interagir avec VAP, une protéine transmembranaire résidente du RE ; (ii) un domaine START lui permettant d'extraire et de transférer le céramide du RE vers la membrane de l'appareil de Golgi ; (iii) un domaine PH (Pleckstrin Homology), lui permettant d'interagir avec les phosphatidylinositol-4-monophosphates, particulièrement abondants au sein du feuillet externe de la partie trans de l'appareil de Golgi (Hanada *et al.*, 2003). Cette protéine serait ainsi responsable du trafic non vésiculaire ATP-dépendant du céramide, destiné à la synthèse de la SM, du RE vers le trans Golgi. Sa fonction pourrait être régulée par phosphorylation sur des résidus sérine (Hanada *et al.*, 2003). Ce transfert serait d'autant plus facilité par l'existence de contacts étroits entre certaines parties du RE et certaines parties du trans-Golgi (Marsh *et al.*, 2001). Il est à noter que ce type de contacts existe également entre des parties du RE et de la mitochondrie, parties de membranes appelées les MAM (Mitochondrial Associated Membranes) (Marsh *et al.*, 2001). Le céramide ainsi transporté à l'appareil de Golgi transloque vers le feuillet interne pour y être converti en SM, le sphingolipide le plus abondant, dans le trans-Golgi. Cette réaction est catalysée par les SMS (sphingomyéline synthase) 1 et 2 (cf. chapitre II.4), deux enzymes possédant plusieurs domaines transmembranaires. La SMS1 est localisée au niveau du trans-Golgi tandis que la SMS2 est également localisée à la membrane plasmique où elle pourrait être impliquée dans la resynthèse de SM à partir de céramide généré par hydrolyse de SM (cf. chapitre II.1.2.2). Au sein de l'appareil de Golgi, le galactosylcéramide peut être métabolisé en sulfatide. Le céramide peut également être converti en glucosylcéramide par la GCS (glucosylcéramide synthase), une réaction ayant lieu sur le feuillet cytosolique de l'appareil de Golgi. La synthèse de glucosylcéramide, précurseur de nombreux glycosphingolipides, est essentielle au développement embryonnaire chez les mammifères (Yamashita *et al.*, 1999). Une partie du glucosylcéramide doit ensuite transloquer vers la lumière golgienne, potentiellement *via* l'action d'un transporteur de type ABC, être véhiculée en direction du trans-golgi pour être transformé en lactosylcéramide et autres glycosphingolipides dérivés. En effet, la lactosylcéramide synthase, responsable de la synthèse de lactosylcéramide à partir de glucosylcéramide et d'UDP-galactose, ainsi que les enzymes responsables de la synthèse des gangliosides et des glycosphingolipides neutres, sont préférentiellement localisées dans le trans-golgi. Il a initialement été proposé que le

glucosylcéramide destiné à la synthèse de glycosphingolipides soit transféré entre les différents compartiments golgiens par un mécanisme vésiculaire. A l'inverse, une étude récente suggère l'existence d'un transport non vésiculaire du glucosylcéramide, du cis vers le trans-golgi, mettant en jeu la protéine FAPP2 (D'Angelo *et al.*, 2007). Cette protéine, qui possède un domaine PH, lie le phosphatidylinositol-4-phosphate abondant dans les membranes trans-golgiennes (D'Angelo *et al.*, 2007). Un autre groupe a proposé que le glucosylcéramide synthétisé au niveau de l'appareil de Golgi soit transporté de façon rétrograde vers le RE par FAPP2 ou il transloquerait dans la lumière puis serait de nouveau transporté vers l'appareil de Golgi par transport vésiculaire pour être transformé en glycosphingolipides (Halter *et al.*, 2007). Selon cette étude, FAPP2 serait également impliquée dans un mécanisme de transport du glucosylcéramide du RE vers la membrane plasmique (Halter *et al.*, 2007). Les gangliosides sont majoritairement dérivés du lactosylcéramide. Leur synthèse nécessite le transfert d'un galactose sur le glucosylcéramide par l'action d'une lactosylcéramide synthase, puis met successivement en jeu une ou plusieurs sialylytransférases et/ou N-AcétyleGalactosamine transférases. Les gangliosides seront ensuite véhiculés par trafic vésiculaire vers la membrane plasmique.

Le céramide peut également être phosphorylé sur le groupement hydroxyl en C1 pour générer du céramide-1 Phosphate. Cette réaction serait catalysée par la CERK (céramide kinase), enzyme dont le gène humain a été cloné en 2002 (Sugiura, 2002). Cette phosphotransférase possède un domaine PH nécessaire à sa liaison aux membranes cellulaires, à sa conformation normale et à son activité catalytique. Son activité est optimale à pH neutre et peut être augmentée en présence de calcium. Elle est essentiellement retrouvée au niveau du trans Golgi et un peu à la membrane plasmique. Le céramide peut aussi être dégradé par des céramidases en sphingosine (cf. chapitre II.1.2.2). La sphingosine alors générée peut être phosphorylée par les SK (sphingosine kinases) pour former de la S1P (sphingosine 1-phosphate) dans le cytosol. La sphinganine peut de la même façon être phosphorylée en Sa1P (sphinganine 1-phosphate) par les SKs. On distingue deux isoformes de SK : la SK1 et la SK2. Selon le type cellulaire, le variant d'épissage considéré et son degré de phosphorylation, la localisation de la SK1 varie, puisqu'elle a été largement retrouvée dans le cytosol, associée au cytosquelette, mais qu'elle peut également être transloquée à la membrane plasmique, au niveau nucléaire, voire être sécrétée. La SK2 présente une localisation essentiellement nucléaire ou péri-nucléaire. Comme la SK1, elle peut phosphoryler la sphingosine et la sphinganine. A l'inverse de la SK1, la SK2 phosphoryle

également la phytosphingosine. Les SK1 et SK2, bien que catalysant le même type de réaction semblent souvent avoir des fonctions opposées vis-à-vis de la prolifération cellulaire. Toutefois, elles partageraient aussi des fonctions redondantes au cours du développement embryonnaire étant donné que les souris doubles-KO SK1 et SK2 ne sont pas viables, contrairement aux souris KO pour une seule des deux isoformes.

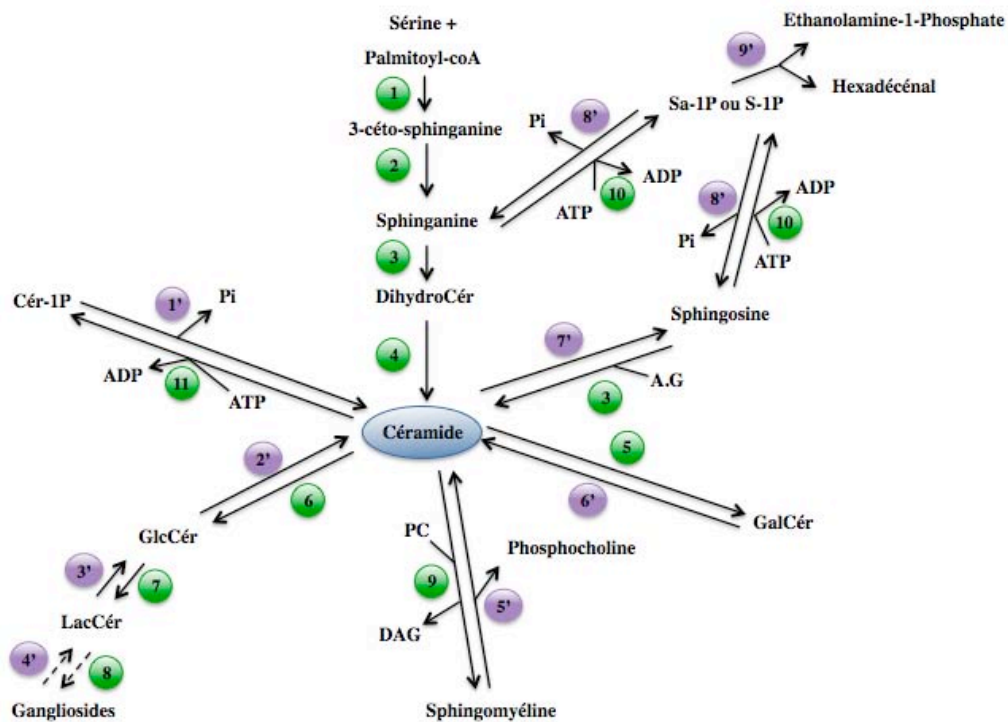


Figure 19. Métabolisme des sphingolipides. En vert et numérotés en n, les réactions de l'anabolisme des sphingolipides, en violet et numérotés en n', les réactions du catabolisme. Anabolisme : 1 : Sérine Palmitoyl Transférase ; 2 : 3-céto-sphinganine réductase ; 3 : (dihydro) Céramide Synthases ; 4 : Dihydrocéramide Désaturase ; 5 : GalactosylCéramide Synthase ; 6 : GlucosylCéramide Synthase ; 7 : LactosylCéramide Synthase ; 8 : Plusieurs enzymes interviennent dont des Sialyltransférases, N-Acetylgalactosamine Transférases ; 9 : Sphingomyéline Synthases ; 10 : Sphingosine Kinases ; 11 : Céramide Kinase ; 1' : Céramide 1-Phosphate Phosphatase ; 2' : GlucosylCéramidase ; 3' : LactosylCéramide β -galactosidase ; 4' : Plusieurs enzymes interviennent, dont des Sialidases, Hexosaminidases, galactosidases ; 5' : Sphingomyélinases ; 6' : GalactosylCéramidase ; 7' : Céramidases ; 8' : Sphingosine-1 Phosphate Phosphatase ; 9' : Sphingosine 1-Phosphate Lyase. Les flèches pointillées indiquent la présence d'une ou plusieurs réactions impliquant une ou plusieurs enzymes différentes. A.G : Acide Gras. GalCér : GalactosylCéramide ; Cér-1P : Céramide -1 Phosphate ; PC : PhosphatidylCholine ; DAG : DiacylGlycérol ; DihydroCér : DihydroCéramide ; ADP : Adénosine DiPhosphate ; ATP : Adénosine Tri Phosphate, Pi : Phosphate inorganique ; Sa-1P : Sphinganine-1 Phosphate ; S-1P : Sphingosine 1Phosphate. D'après (Sabourdy *et al.*, 2008).

II.1.2.2 Catabolisme des sphingolipides.

Le catabolisme des sphingolipides met en jeu de nombreuses enzymes dont la plupart sont localisées au niveau lysosomal. Les sphingolipides atteignent ce compartiment par endocytose, autophagie ou phagocytose.

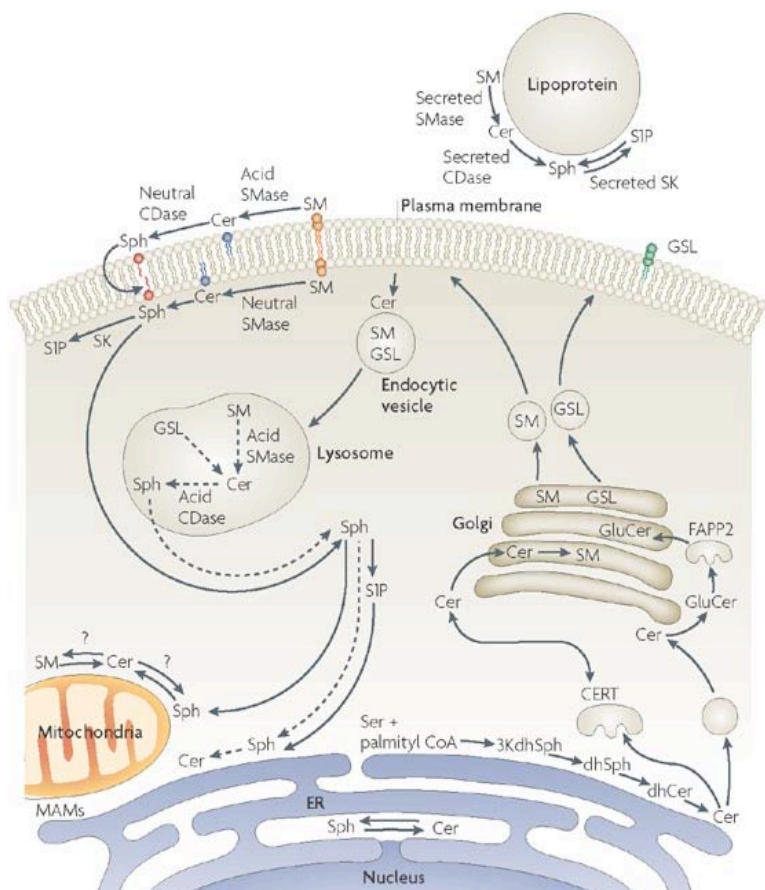
Tous les sphingolipides peuvent être dégradés, en une ou plusieurs étapes, pour former du céramide. Ainsi, le céramide-1-phosphate peut être déphosphorylé en céramide par une céramide-1-phosphate-phosphatase, sachant que cette activité enzymatique n'a essentiellement été retrouvée que dans des fractions de membrane plasmique de tissus hépatiques et cérébraux (Boudker & Futerman, 1993 ; Shinghal *et al.*, 1993). La S1P, générée par la SK1 ou 2, peut être déphosphorylée ou dégradée au sein du RE par deux types d'enzymes différents : (i) la S1P Phosphatase, dont il existe deux isoformes, qui déphosphoryle la S1P et (ii) la S1P lyase qui induit la formation de deux produits de dégradation, l'héxadécénal et l'éthanolamine phosphate. Cette dernière réaction est irréversible et constitue donc la voie de sortie majeure du métabolisme sphingolipidique.

Le glucosylcéramide peut être dégradé en céramide par l'action d'une glucosylcéramidase, enzyme lysosomale dont la déficience est à l'origine de la maladie de Gaucher (cf. chapitre II.2). Le galactosylcéramide peut également être dégradé en céramide par une galactosylcéramidase lysosomale dont la déficience provoque la maladie de Krabbe. Le lactosylcéramide, précurseur de la grande majorité des gangliosides est dégradé par une lactosylcéramide- β -galactosidase en glucosylcéramide. Les gangliosides sont également dégradés dans les lysosomes, par l'action d'une ou plusieurs sialidases, hexosaminidases, galactosidases, dont certains déficits peuvent également conduire à l'apparition de certaines sphingolipidoses. De plus, la dégradation de certains glycosphingolipides nécessite également l'action de protéines nommées SAP (pour Sphingolipid Activator Proteins) qui permettraient de rendre disponible les GSLs aux enzymes assurant leur dégradation.

La sphingomyéline est le sphingolipide complexe le plus abondant. Sa dégradation est réalisée par des enzymes nommées SMases (sphingomyélinases), résultant en une production de céramide et de phosphocholine (pour revue, Milhas *et al.*, 2009). Les SMases sont classées selon le pH optimal pour leur activité catalytique : on distingue ainsi la SMase acide et des SMases neutres. La aSMase (SMase acide), codée par le gène *SMPDI*, est présente sous deux

formes : une forme, majoritaire, lysosomale et une forme sécrétée. Trois sphingomyélinases neutres, nSMases 1, 2 et 3 ont été identifiées à ce jour chez les mammifères, codées respectivement par les gènes *SMPD 2, 3 et 4*. La nSMase 1 serait localisée au niveau du RE, mais son activité en tant que nSMase a été remise en cause. La nSMase 2 est localisée au niveau du feuillet cytosolique de la membrane plasmique et de l'appareil de Golgi, bien que la SM soit classiquement considérée comme étant particulièrement localisée au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique. Cette enzyme est plus fortement exprimée dans les tissus cérébraux. La nSMase 3 est localisée au niveau du RE et semble être majoritairement exprimée dans les muscles squelettiques et cardiaques. L'existence d'une sphingomyélinase neutre mitochondriale (MA-nSMase) a également été récemment proposée.

Figure 20. Localisation subcellulaire du métabolisme des sphingolipides. La synthèse *de novo* du céramide a lieu au sein du RE, dans des membranes associées au RE telle que l'enveloppe nucléaire ou des membranes associées aux mitochondries (MAMs). Le céramide est ensuite transporté vers l'appareil de Golgi, par CERT ou par transport vésiculaire, pour être respectivement métabolisé en SM ou GlcCér. Ce dernier sera alors transféré au niveau du feuillet cytosolique pour être métabolisé en glycosphingolipides, dont la synthèse nécessite la présence de FAPP2. La SM et les GSLs peuvent être véhiculés à la membrane plasmique par transport vésiculaire. La SM pourra alors être métabolisée par une sphingomyélinase. Une partie des enzymes du métabolisme des sphingolipides sont également présentes dans la circulation. Les sphingolipides peuvent ensuite être internalisés par endocytose et être dégradés par des sphingomyélinases et des glucosidases permettant de générer du céramide. Le céramide est catabolisé en sphingosine par une céramidase. La sphingosine pourra ensuite être phosphorylée par la SK1. La S1P peut être déphosphorylée par une S1P phosphatase dans le RE et permettre une synthèse de céramide à partir de la sphingosine libérée par une voie dite de recyclage (Hannun & Obeid, 2008).



Le céramide peut être dégradé par des céramidases en sphingosine. Il existe 5 céramidases humaines distinguées selon le pH nécessaire pour leur activité catalytique optimale (acide, neutres ou alcalines) (Mao & Obeid, 2008). La céramidase acide, codée par le gène *ASAHI*, est localisée au niveau lysosomal, organe au sein duquel le pH acide

permettrait son activation par auto-protéolyse. Elle peut également être sécrétée. Son expression est ubiquitaire et un déficit de cette enzyme est à l'origine de la maladie de Farber (cf. chapitre II.2). La céramidase neutre, codée par le gène *ASAH2*, est une enzyme O-glycosylée essentiellement localisée au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique. Son expression est particulièrement élevée au niveau intestinal où elle participerait à la digestion des sphingolipides d'origine alimentaire (Kono, 2006). Trois céramidasés alcalines, 1, 2 et 3, ont été décrites, respectivement codées par les gènes *ASAH3*, *ASAH3L* et *PHCA*. La céramidase alcaline 1 est essentiellement exprimée au niveau épidermique, tandis que les deux autres céramidasés alcalines sont ubiquitaires. La céramidase alcaline 1 est localisée au niveau du RE, la céramidase alcaline 2 est localisée au niveau de l'appareil de Golgi et la céramidase alcaline 3 est retrouvée au niveau du RE et de l'appareil de Golgi. La sphingosine générée par les différentes céramidasés peut ensuite être utilisée dans la voie de recyclage (Sabourdy *et al.*, 2008).

II.2. Conséquences pathologiques des altérations du métabolisme sphingolipidique : les sphingolipidoses.

L'importance des sphingolipides dans la physiologie a été particulièrement mise en évidence par l'identification de plusieurs sphingolipidoses, des maladies associées à des défauts de leur métabolisme, le plus fréquemment de leur catabolisme (pour une revue détaillée, Sabourdy *et al.*, 2008). Les sphingolipidoses peuvent également être liées à un défaut d'adressage des enzymes du métabolisme à leur compartiment subcellulaire habituel ou à un déficit de cofacteur enzymatique. Potentiellement également, des altérations du transport des sphingolipides eux-mêmes pourraient aussi conduire à des pathologies similaires. De nombreux groupes de recherche ont généré des souris déficientes en certaines enzymes du métabolisme des sphingolipides permettant une meilleure compréhension du rôle physiologique et physiopathologique de ces différents lipides. Les sphingolipidoses sont caractérisées par l'accumulation d'un sphingolipide en particulier, le plus souvent au sein du compartiment endolysosomal et la plupart de ces maladies font donc partie d'un ensemble de maladies dites de surcharge lysosomale. L'apparition de ces pathologies pourrait être la résultante, non seulement, de l'accumulation du substrat, mais également de la diminution des produit(s) de la réaction enzymatique concernée, voire des deux phénomènes.

Concernant les enzymes lysosomales du métabolisme sphingolipidique, leur localisation nécessite leur adressage à cet organite. Cet adressage dépend de la présence d'un mannose-6-phosphate, modification post-traductionnelle qui a lieu au sein de l'appareil de Golgi *via* l'action successive de deux enzymes sur des oligosaccharides riches en mannose : l'ajout d'un groupement N-acétylglucosamine-1-phosphate puis le retrait du groupement N-acétylglucosamine. Le mannose-6-phosphate ainsi exposé interagit avec un récepteur mannose-6-phosphate au niveau du trans-golgi, permettant l'adressage des enzymes vers le lysosome. Le déficit en N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase conduit à l'apparition d'une maladie génétique rare nommée I-Cell-Disease, (pour revue, Kollmann *et al.*, 2010). Cette maladie est en effet caractérisée par la présence d'inclusions au sein des lysosomes, particulièrement enrichies en sphingolipides qui ne peuvent être dégradés en raison d'un défaut de mannose-6-phosphorylation et donc d'adressage de plusieurs enzymes lysosomales du catabolisme des sphingolipides. Les patients présentent généralement plusieurs signes morphologiques et psychiques, tels qu'une hépatomégalie, des dysmorphies faciales, des limitations articulaires, un retard psychomoteur. La maladie conduit au décès des patients au cours des 8 premières années de vie par complications cardiorespiratoires. Il est à noter que des récepteurs mannose-6-phosphate et mannose sont également exprimés à la surface cellulaire et permettent l'endocytose d'enzymes mannose-6-phosphorylées extracellulaires vers le lysosome, mécanisme mis à profit pour des enzymothérapies substitutives pour le traitement de certaines maladies lysosomales. Certaines enzymes, comme la GlucosylCéramidase, sont adressées au lysosome indépendamment de la présence d'un résidu mannose-6-phosphate (Reczek *et al.*, 2007).

De nombreuses pathologies sont liées à des défauts de dégradation des GSLs au sein du lysosome (Figure 21), seules certaines seront évoquées dans la suite de ce paragraphe. De nombreuses hydrolases sont responsables de la dégradation des GSLs et l'absence de l'une d'entre elles induit l'accumulation de son substrat respectif et peut conduire à l'apparition d'une pathologie de surcharge lysosomale. Par exemple, des mutations ponctuelles, ou des délétions du gène codant pour la GalCér β -galactosidase, provoque la maladie de Krabbe chez l'Homme, une leucodystrophie récessive fatale au cours de la petite enfance (Suzuki & Suzuki, 1970). Au niveau sphingolipidique, cette pathologie se caractérise notamment par une accumulation de psychosine (ou galactosyl-sphingosine), un sphingolipide normalement présent à l'état de traces chez l'individu sain, qui serait à l'origine des anomalies cellulaires

observées au cours de cette pathologie. Il existe plusieurs modèles murins de la maladie de Krabbe, un qui correspond strictement à la maladie génétique humaine, avec une mutation de la GalCér β -galactosidase, et un autre qui correspond à une mutation de la saposine A, un cofacteur activateur de cette enzyme. La maladie de Gaucher est la sphingolipidose liée à un défaut de dégradation de GSLs la plus fréquente, avec une incidence de 1/60000 par an en France. Elle résulte d'une déficience en glucosylcéramidase et en une accumulation de GlcCer au niveau lysosomal. Il est à noter que les patients atteints de la maladie de Gaucher ont un risque accru de développer certaines pathologies cancéreuses telles que le myélome multiple et des carcinomes hépatocellulaires (De Fost *et al.*, 2006), ce qui laisse penser que certaines anomalies du métabolisme sphingolipidique pourraient être pro-tumorales.

Des mutations homozygotes dans le gène *SMPD1*, qui code pour la SMase acide conduisent à l'apparition d'une maladie de surcharge lysosomale, la maladie de Niemann-Pick (Brady *et al.*, 1966). Cette maladie se caractérise par une accumulation de SM lysosomale dans plusieurs tissus et se traduit par des symptômes plus ou moins marqués tels que des atteintes neurologiques, une hépatosplénomégalie et une atteinte pulmonaire. Les malades présentant les différents symptômes, dont la neuropathie, souffrent d'un Niemann Pick de type A, avec une perte totale d'activité sphingomyélinase acide, et décèdent généralement dans les trois premières années de leur vie. A l'inverse, les patients atteints de la forme, non neurologique, de type B, ont une activité sphingomyélinase acide résiduelle et peuvent vivre jusqu'à l'âge adulte. Des souris KO pour la aSMase ont été générées. Ces souris présentent des atteintes nerveuses qui s'aggravent au fil du temps, une atrophie cérébrale, des taux de SM particulièrement élevés dans le foie et le cerveau et un poids corporel réduit par rapport au souris sauvages. Elles meurent prématurément à l'âge de 8 mois (Horinouchi *et al.*, 1995).

Des mutations du gène *ASAH1*, codant pour la céramidase acide, sont responsables d'une maladie héréditaire autosomique récessive rare : la maladie de Farber. Les patients atteints de cette maladie présentent généralement des atteintes neurologiques, associées à une hépto-splénomégalie, des vomissements, de l'arthrite et des adénopathies. Ils décèdent au cours de la petite enfance. Les souris KO pour ce gène meurent au cours du développement embryonnaire tandis que certaines cellules, notamment hépatiques, d'animaux hétérozygotes

présentent une accumulation de vacuoles lipidiques intracellulaires au cours du temps (Li *et al.*, 2002).

Concernant les enzymes de l'anabolisme sphingolipidique, des mutations ponctuelles du gène *SPTLC1* codant pour SPT1 induisent une neuropathie héréditaire sensitive et autonome de type I, maladie dominante rare (Dawkins *et al.*, 2001 ; Bejaoui *et al.*, 2001). Cette maladie est caractérisée par une dégénération progressive des neurones sensitifs, avec une apparition de symptômes vers 20-30 ans. Les souris KO pour ce gène ou pour *SPTLC2* meurent à l'état embryonnaire (Hojjati *et al.*, 2005).

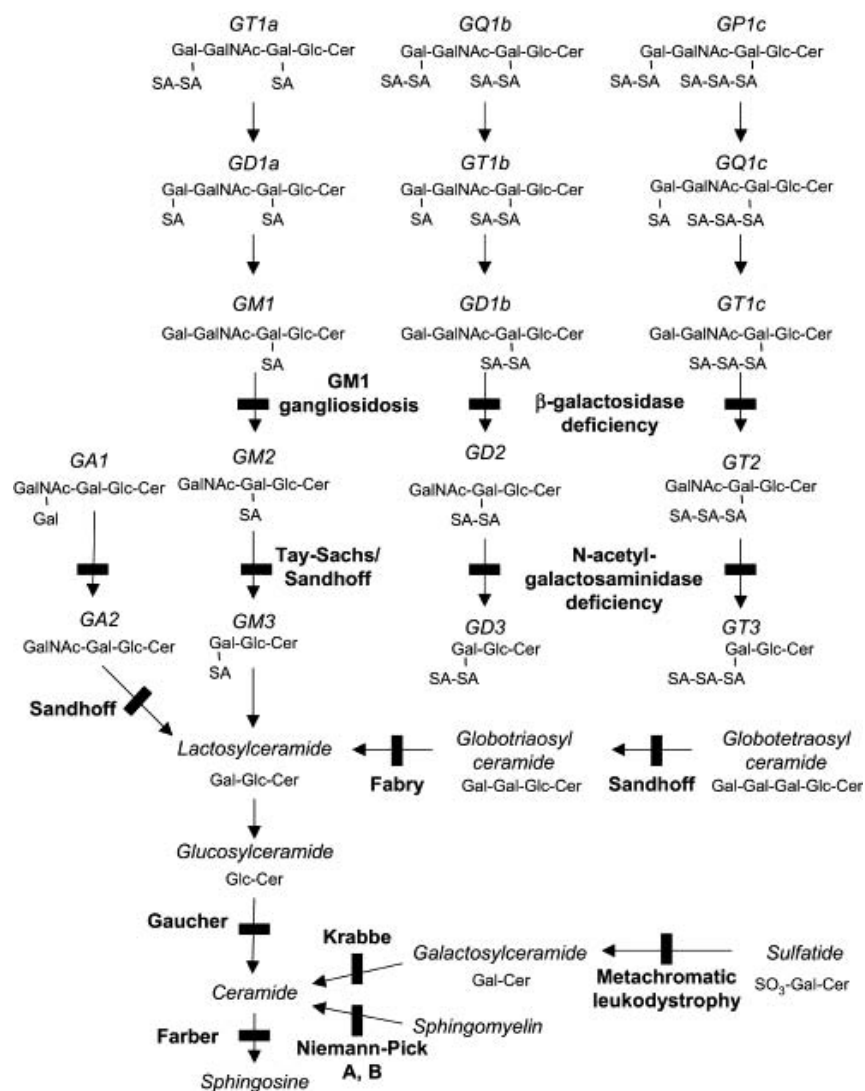


Figure 21 : Principales maladies liées à un défaut de dégradation des sphingolipides. Les noms des différentes pathologies et la réaction catalytique affectée correspondante sont représentées en gras. Les sialidoses, pathologies résultant d'un déficit en sialidases, enzymes qui retirent les groupements d'acides sialiques, ne sont pas représentés ici. Cer : ceramide, GalNAc : N-acetylglucosamine, SA : acide sialique (Ginzburg *et al.*, 2004).

II.3. Principaux rôles des sphingolipides dans la signalisation cellulaire.

II. 3. 1. Introduction : divers rôles des SLs dans la signalisation cellulaire.

Les sphingolipides jouent des rôles très variés, dans la prolifération, la migration, la différenciation, l'adhésion et la mort cellulaire. En cancérologie, certains sphingolipides, tels que la sphingosine-1-phosphate sont considérés comme étant des onco-métabolites, en faveur du développement et de la progression tumorale. A l'inverse, d'autres sphingolipides tels que la sphingosine et le céramide sont considérés comme des anti-onco-métabolites, favorisant l'arrêt dans le cycle cellulaire et la mort cellulaire et s'opposant donc à la croissance tumorale.

La sphingosine-1-phosphate constitue le chef de file des sphingolipides en faveur de la prolifération cellulaire et son rôle en tant que tel a été proposé dès le début des années 1990 par l'équipe dirigée par Sarah Spiegel (Zhang *et al.*, 1991). Ce lipide est synthétisé par les sphingosine kinases. La SK1 est activée par de nombreux facteurs de croissance tels que le PDGF, le VEGF, le bFGF et l'EGF, et participerait à l'effet prolifératif de certains de ces facteurs (Olivera & Spiegel, 1993). L'action de la S1P serait majoritairement extracellulaire, mais elle posséderait également des cibles intracellulaires. Ainsi, la S1P extracellulaire peut se lier à des récepteurs de la famille EDG (Endothelial Differentiation Gene), qui possèdent 7 domaines transmembranaires et sont couplés à des protéines G. Il existe 5 récepteurs différents de la S1P. L'activation de certains de ces récepteurs favorise des voies mitogènes et pourrait également participer aux effets pro-migratoires de certains facteurs de croissance (Hobson *et al.*, 2001). L'action oncogénique de la S1P a été notamment suggérée suite à l'observation selon laquelle la surexpression de la SK1 permet une stimulation de la croissance de cellules tumorales, à la fois *in vitro* et *in vivo* et que la SK1 pourrait permettre l'acquisition de propriétés cancéreuses (Xia *et al.*, 2000). L'action physiologique de la S1P semble également être particulièrement importante pour promouvoir le développement cardio-vasculaire et l'angiogénèse, *via* son action sur plusieurs de ses récepteurs. Ceci a notamment un impact en Cancérologie, puisqu'il a été mis en évidence que la S1P pouvait avoir un effet pro-tumoral en favorisant l'angiogénèse tumorale. En effet, l'injection d'un anticorps monoclonal anti-S1P à des souris allo- ou xéno-greffées avec divers types de cellules tumorales permet de réduire le volume ainsi que la vascularisation des tumeurs (Visentin *et al.*, 2006). Il a par ailleurs été mis en évidence que l'hypoxie pouvait induire l'expression de la SK1 (Schwalm *et al.*, 2008). Au delà de son rôle en faveur de la prolifération cellulaire tumorale et l'angiogénèse, la génération de S1P par la SK1 pourrait

aussi favoriser la résistance de cellules à la mort dépendante du céramide, et notamment en réponse à plusieurs molécules de chimiothérapie et au TNF (Bonhoure *et al.*, 2008) (Cuvillier *et al.*, 1996). De façon intéressante, la SK1 est elle-même dégradée de manière cathepsine B dépendante en réponse à certains agents endommageant l'ADN mais également en réponse au TNF (Taha, 2005). Il est à noter que la SK2 semble avoir un effet opposé à celui de la SK1 vis-à-vis de la survie cellulaire. Ainsi, alors que la surexpression de la SK1 confère un avantage prolifératif, la surexpression de la SK2 pourrait favoriser l'apoptose cellulaire. Par ailleurs, l'équipe de Thierry Levade a récemment mis en évidence que des fibroblastes isolés d'embryons de souris déficientes en Sphingosine 1 Phosphate Lyase, qui dégrade irréversiblement la S1P, présentaient une croissance cellulaire accélérée ainsi qu'une capacité à former des clones en agar et des tumeurs chez les souris Nude accélérée par rapport à des fibroblastes contrôles. Cette étude suggère que la S1P Lyase joue un rôle suppresseur de tumeur et renforce l'idée selon laquelle la modulation des enzymes responsables du métabolisme de la S1P est une stratégie intéressante en thérapie anti-cancéreuse (Colie *et al.*, 2009).

II. 3. 2. Fonction des sphingolipides dans la mort cellulaire : rôle du céramide dans la cytotoxicité.

II.3.2.1 Généralités.

Plusieurs arguments ont été avancés dans la littérature en faveur d'un rôle du céramide comme inhibiteur de la croissance cellulaire et/ou inducteur de mort cellulaire, en particulier d'apoptose (Figure 22) :

De nombreux signaux de stress cellulaire induisent une accumulation de céramide physiologique dans différents types cellulaires sensibles, mais pas dans les cellules résistantes à la toxicité induite par ces signaux. Ces signaux sont très divers. En effet, il peut s'agir de cytokines, telles que l'IL1- β , des ligands des récepteurs de mort (cf. chapitre II.3.2.2.), d'agents chimiothérapeutiques (tels que la daunorubicine, l'étoposide, la cytarabine), de stress environnementaux (tels que les radiations ionisantes, des UV), d'un choc thermique, de l'hypoxie, d'une privation en facteur de croissance, d'infections virales ou bactériennes. Ces élévations de céramide sont la résultante de la régulation d'une ou de plusieurs enzymes du métabolisme des sphingolipides. Elles varient en terme d'intensité et de cinétique, selon le

stress inducteur, le type cellulaire ainsi que la nature des enzymes du métabolisme des sphingolipides mises en jeu. Dans la plupart des cas, ces élévations ont lieu avant ou de façon concomitante à l'apparition de caractéristiques morphologiques de mort cellulaire, laissant supposer qu'elles puissent avoir un rôle causal dans certaines signalisations de mort.

La synthèse *de novo* de céramide intervient dans la mort cellulaire induite par différents stimuli. Ainsi, il a initialement été mis en évidence que l'incubation de lignées cellulaires leucémiques avec de la daunorubicine, un agent chimiothérapeutique anti-cancéreux, induit une élévation de céramide attribuée à une activation de sa synthèse *de novo* (Bose *et al.*, 1995). De plus, une activation de la sérine palmitoyltransférase a également été impliquée dans l'apoptose induite par l'étoposide dans des cellules leucémiques humaines MOLT-4 (Perry *et al.*, 2000). Une activation de la synthèse *de novo* pourrait également être impliquée dans l'élévation de céramide et l'AICD de cellules B (Kroesen *et al.*, 2001). Les SMases sont également activées et impliquées dans la mort cellulaire induite par divers stimuli, tels que certains agents chimiothérapeutiques, le choc thermique, l'ischémie/reperfusion et l'action de certaines cytokines. Par exemple, des études indiquent l'implication de l'activation de SMases acide et neutre dans la mort induite par l'irradiation, *in vitro* et *in vivo* (Santana *et al.*, 1996 ; Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994). De façon intéressante, une absence d'activation de SMase neutre a été observée dans des cellules myéloïdes résistantes à l'irradiation (Bruno *et al.*, 1998). L'activation de SMases, pouvant résider ou être recrutées à la membrane plasmique, plus spécifiquement au sein de microdomaines riches en SM, intervient dans la génération de céramide en réponse à la liaison de certains ligands de récepteurs, tels que l'IL1- β (Liu & Anderson, 1995). La génération de céramide par l'activation d'une SMase neutre au sein des microdomaines a aussi été observée en réponse à certaines molécules de chimiothérapie, comme l'aracytidine et la daunorubicine (Grazide *et al.*, 2002). Les SMases ont, par ailleurs, été impliquées dans la mort induite par les ligands des DR (cf. chapitre II.3.2.2). Le taux de céramide peut également être modulé par les céramidases qui le dégradent en sphingosine, sphingolipide favorisant la mort cellulaire. L'accumulation de céramide peut également être la résultante d'une inhibition de sa transformation en sphingolipides plus complexes. Ainsi, plusieurs arguments dans la littérature ont également mis en évidence une inhibition de l'activité de synthèse de SM participant à l'accumulation de céramide dans des cellules sensibles à certains stress (cf. chapitre II.4).

Les élévations de céramide et la mort cellulaire peuvent être induites en incubant les cellules en présence de céramides exogènes ou des analogues de céramide. Dans la majorité des cas, l'incubation de cellules avec des céramides exogènes, qu'il s'agisse de chaînes courtes (C2 ou C6 classiquement) ou longues (C16, un céramide naturel), favorise une mort de type apoptotique. Ainsi, l'incubation de cellules Jurkat avec du C2 céramide induit une activation de la caspase 3 et un inhibiteur des caspases effectrices empêche l'apoptose induite par le C2-céramide ou par une SMase exogène (Tepper *et al.*, 1997). Le traitement de types cellulaires très divers, comme les cellules U937, une lignée de lymphome humain ou des cellules endothéliales cérébrales bovines par du C2-céramide induit l'apparition d'une fragmentation internucléosomale de l'ADN (Xu *et al.*, 1998 ; Obeid *et al.*, 1993). Le traitement de cellules de carcinome colique avec des analogues de céramide induit un relargage du cytochrome c et une activation des caspases conduisant à l'apoptose (Selzner *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'incubation de cellules HeLa avec du C6-céramide, qui est métabolisé au sein de la cellule en sphingosine, provoque une fragmentation de l'appareil de Golgi suivi du détachement de la cellule de son support et d'une mort par anoïkis (Hu *et al.*, 2005).

Le céramide, produit de façon endogène en réponse à certains stress, ou ajouté dans le milieu de culture, activerait la voie mitochondriale de l'apoptose. La mort induite par le céramide ou des analogues de céramide, s'accompagne en effet d'une perméabilisation de la membrane mitochondriale et sa cytotoxicité peut être inhibée par la surexpression de protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-XL (Zhang *et al.*, 1996 ; Granot *et al.*, 2006 ; Allouche *et al.*, 1997 ; Sawada *et al.*, 2000). De plus, des cellules carcinomateuses déficientes en Bax résistent à l'apoptose induite par le C2-céramide (von Haefen *et al.*, 2002). Il a également été mis en évidence que le céramide pouvait avoir un effet inhibiteur sur la fonction mitochondriale, par exemple en inhibant des composants de la chaîne respiratoire (Gudz *et al.*, 1997 ; García-Ruiz *et al.*, 1997). Par ailleurs, une étude d'expression ectopique d'une SMase bactérienne dans différents organites cellulaires montre que seule une SMase adressée à la mitochondrie induit l'apoptose des cellules MCF-7, suggérant qu'une élévation de céramide, qui pourrait potentiellement favoriser la translocation de Bax au sein de ce compartiment, est particulièrement délétère pour la cellule (Birbes *et al.*, 2001 ; Birbes *et al.*, 2005). Enfin, le céramide lui-même pourrait former des pores au sein de la membrane mitochondriale et ainsi moduler sa perméabilité (Siskind, 2005 ; Colombini, 2010).

Des élévations de céramide, en réponse, ou non, à des signaux de stress cellulaires peuvent être régulées en modulant génétiquement ou pharmacologiquement l'activité des enzymes responsables de son accumulation. Par exemple, l'inhibition de la synthèse *de novo* de céramide par la fumonisine B1 est un des arguments ayant permis de mettre en évidence son implication dans l'apoptose induite par la daunorubicine (Bose *et al.*, 1995), mais aussi par l'étoposide et l'angiotensine II. L'implication d'une SMase acide dans différentes signalisations de stress, notamment suite à la stimulation de CD95 (cf. chapitre II.3.2.2) a été largement étudiée *via* l'utilisation de cellules dérivées de souris KO pour la SMase acide. De plus, des cellules déficientes en SMase acide résistent aux radiations ionisantes (Santana & others, 1996) et aux UVA (Zhang, 2001). Par ailleurs, le traitement de cellules de carcinome colique avec le B13, un inhibiteur de céramidase, induit une élévation de céramide et leur mort par apoptose (Selzner *et al.*, 2001). Concernant le rôle de la synthèse de glucosylcéramide et de gangliosides qui en dérivent, une partie de la littérature suggère qu'elle pourrait également être considérée comme un moyen de promouvoir la survie cellulaire. Plusieurs études concernant le glucosylcéramide se sont concentrées sur son action en tant que promoteur de la résistance à des molécules de chimiothérapie anti-tumorale. L'inhibition de l'activité de synthèse de glucosylcéramide a été montrée comme capable d'induire la mort de cellules MDR (Multi Drug Resistant) (Nicholson *et al.*, 1999). Il a également été mis en évidence que plusieurs lignées de cellules cancéreuses de différents types, résistantes à la doxorubicine, présentent une augmentation d'expression et d'activité GCS, et que la diminution de l'expression de cette enzyme permettait de les sensibiliser à la mort induite par cet agent chimiothérapeutique (Liu *et al.*, 2008). Il a par ailleurs été observé que des cellules leucémiques de patients chimiorésistants présentent une activité GCS augmentée (Itoh *et al.*, 2003). Certaines études ont toutefois minimisé depuis l'importance de la conversion du céramide en glucosylcéramide dans la chimiorésistance (Veldman *et al.*, 2003). De plus, il est à noter que le glucosylcéramide est lui-même le précurseur de nombreux gangliosides qui seraient également capables de moduler la chimiosensibilité. Par exemple, le ganglioside GM3 pourrait participer à la résistance à la doxorubicine et à l'étoposide de cellules carcinomateuses pulmonaires en induisant une augmentation de l'expression de Bcl-2 (Noguchi *et al.*, 2006). De façon intéressante, la conversion de céramide en glycosphingolipides pourrait aussi influencer d'autres phénomènes tels que la transition épithélio-mésenchymateuse, un processus clé dans l'invasion tumorale et le processus métastatique (Guan *et al.*, 2009).

Le céramide pourrait exercer son activité cytotoxique en agissant directement sur des cibles protéiques, dont certaines ont été identifiées, et pourraient moduler la survie cellulaire en agissant dans différents organites. Il a ainsi été mis en évidence que le céramide pouvait se lier et activer des CAPP (Ceramide Activated Protein Phosphatases), PP1 et PP2A (Chalfant, 2003). Par exemple, le céramide, généré par la voie de synthèse *de novo*, est capable d'activer PP1 qui déphosphoryle les protéines d'épissage SR, conduisant à une diminution des formes BcLXL et caspase 9b, inhibitrices d'apoptose, au profit des formes pro-apoptotiques BCLXS et caspase 9 (Chalfant, 2002). Le groupe de Yusuf Hannun a également montré que la privation en sérum dans des cellules MOLT-4 s'accompagnait d'une élévation de céramide à l'origine d'une déphosphorylation de pRb conduisant à un arrêt en G0/G1 (Dbaiibo *et al.*, 1995). Le céramide pourrait également induire l'inhibition de Akt/PKB et PKC α par déphosphorylation (Lee *et al.*, 1996 ; Zhou *et al.*, 1998). Plusieurs autres protéines, telles que PKC ζ , KSR (Kinase Suppressor of Ras), JNK ainsi que la cathepsine D pourraient être activées par le céramide. Il est à noter, toutefois, que ces études n'ont pas apporté de preuve claire de l'existence de ce type d'interaction physique dans la cellule dans le cadre d'une production de céramide endogène en réponse à un stress.

Le céramide peut également induire des morts cellulaires indépendantes des caspases. Ainsi, le traitement de différents types cellulaires par du TNF en présence d'inhibiteur de caspases s'accompagne d'une élévation de céramide qui intervient dans l'induction de mort (Thon *et al.*, 2005). L'incubation de cellules Jurkat avec des analogues de céramide induit une mort cellulaire partiellement inhibée par le zVAD fmk, suggérant que cette mort est en partie caspase-indépendante (Granot *et al.*, 2006). Dans certains cas, la mort de type nécrotique induite par le céramide pourrait également mettre en jeu une perte de fonction mitochondriale (Arora *et al.*, 1997). Le céramide pourrait également induire la macroautophagie dans certaines cellules (Scarlatti, 2004). Il a également été suggéré que ce lipide bioactif pouvait participer à l'induction de l'autophagie, puis à une mort faisant suite à ce processus, *via* la diminution d'expression de transporteurs d'acides aminés et de glucose (Guenther *et al.*, 2008). Ainsi, les auteurs de cette étude ont décrit que l'ajout de céramide exogène, mais également le traitement de cellules avec de la SMase exogène ou avec de la daunorubicine qui induit une élévation intra-cellulaire de céramide, résultait en une diminution de l'expression des transporteurs de nutriments (Guenther *et al.*, 2008).

L'accumulation de céramide au sein des radeaux lipidiques peut favoriser le regroupement de récepteurs membranaires, tels que les DR, et ce regroupement participerait à l'induction de la mort cellulaire par ces récepteurs (cf. chapitre II.3.2.2). Certains agents chimiothérapeutiques ou stress cellulaires ont également été proposés comme induisant une augmentation de céramide au sein de ces microdomaines et favorisant ainsi la signalisation émanant de ces récepteurs, en présence ou non de leur ligand. De plus, des microdomaines enrichis en certains sphingolipides et glycosphingolipides, existent également au sein de certains organites cellulaires, notamment la mitochondrie et le RE, et pourraient donc également y jouer un rôle de modulation de la signalisation.

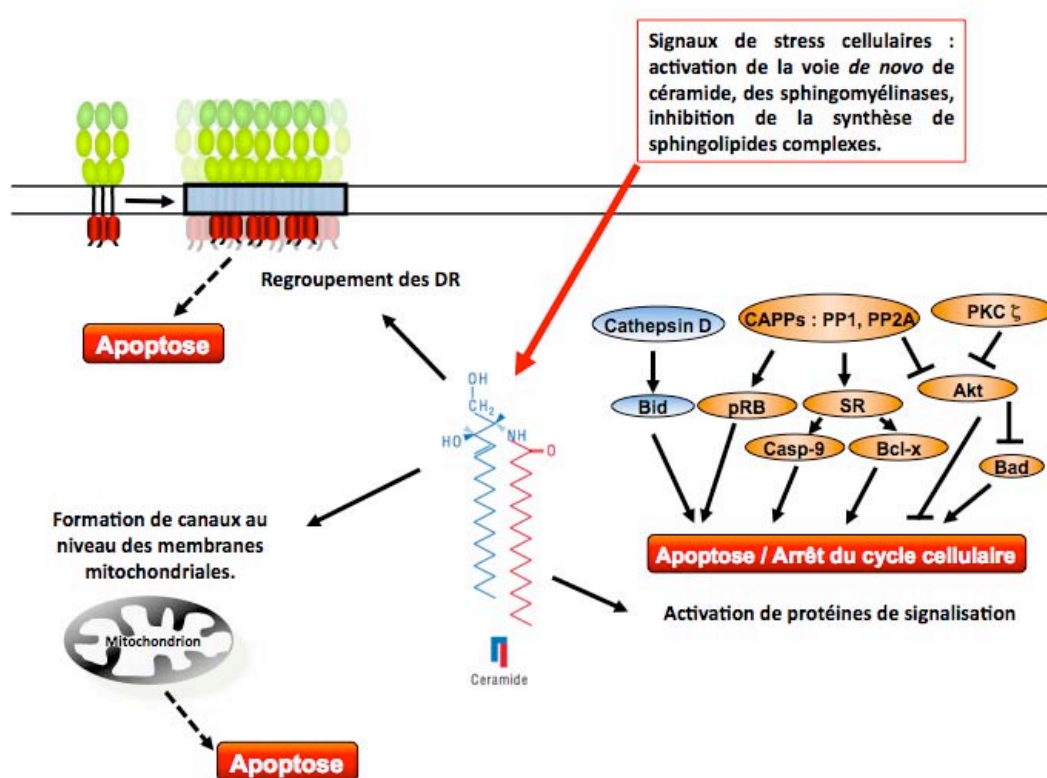


Figure 22. Principaux modes d'action du céramide. Plusieurs signaux de stress modulent le métabolisme sphingolipidique et favorisent une augmentation du taux de céramide. Le céramide produit peut agir à différents niveaux pour induire l'apoptose ou l'arrêt dans le cycle cellulaire. CAPP : Ceramide Activated Protein Phosphatases.

II.3.2.2 Rôle du céramide dans la réponse aux ligands des récepteurs de mort.

Plusieurs études suggèrent l'implication d'élévation de céramide dans la mort induite par les ligands des DR. Elles peuvent être la résultante d'une augmentation de la synthèse *de novo*, d'une inhibition de sa dégradation, d'une activation de l'hydrolyse de sphingolipides complexes, ou d'une inhibition de la synthèse de ces sphingolipides. L'implication de la

synthèse de SM sera développée dans le chapitre suivant. Plusieurs enzymes peuvent donc être régulées de façon séquentielle ou concomitante en réponse à un même stimuli. L'élévation de céramide peut donc être multiphasique et avoir lieu dans des compartiments subcellulaires divers au sein desquels ce lipide pourrait avoir des rôles spécifiques.

II.3.2.2.1 Rôle du céramide dans la réponse à CD95L.

Concernant CD95L, il a été mis en évidence que le traitement de lignées cellulaires leucémiques par un anticorps agoniste anti-CD95 induisait une hydrolyse rapide (dans les 10 premières minutes) et transitoire de la SM en céramide par une SMase acide (Cifone *et al.*, 1994). Le même groupe a montré dans une lignée cellulaire de lymphome HuT78 que l'activation du récepteur CD95 s'accompagnait d'une élévation de céramide dans les 30 premières minutes post-stimulation et que cette élévation était due à l'activation de SMases acide et neutre (Cifone *et al.*, 1995). Dans cette étude, l'activation de la SMase acide nécessitait la présence du DD de CD95 alors que l'activation de la neutre avait lieu même dans des clones exprimant un CD95 dépourvu du DD (Cifone *et al.*, 1995). En 2000, le groupe de Sarah Spiegel a observé, dans des cellules Jurkat, que CD95 induisait une accumulation de céramide biphasique, avec une première accumulation au cours de la première heure de stimulation, avant toute élévation détectable de l'activité des caspases, puis une seconde élévation plus tardive et soutenue, à partir de 3 heures de traitement (Cuvillier, 2000). La même étude indique l'existence d'une accumulation de sphingosine juste après l'accumulation précoce de céramide. L'élévation tardive de céramide peut être inhibée en pré-traitant les cellules avec de la fumonisine B1, un inhibiteur des céramide synthases, et ne semble pas être nécessaire pour l'induction d'apoptose dépendante de CD95. L'inhibition des caspases par le zVAD-fmk prévient les accumulations de céramide et de sphingosine, précoces et tardives (Cuvillier, 2000). Le groupe d'Erich Gulbins a montré que le céramide produit par l'activation d'une aSMase est nécessaire au clustering de CD95 (Grassme, 2001). Ce même groupe propose que l'activation de CD95 permettrait une première activation d'un pool restreint de caspase 8 qui serait suffisant à la translocation de la SMase acide au sein des radeaux lipidiques de la membrane plasmique. La génération de céramide sur le feuillet extracellulaire favoriserait le clustering de CD95, la formation du DISC et l'initiation de l'apoptose (Grassmé *et al.*, 2003). Il a récemment été suggéré que cette translocation se ferait par un phénomène d'exocytose impliquant la protéine t-SNARE syntaxine 4 (Perrotta *et al.*, 2010). Par ailleurs, le groupe de Roberto Testi a mis en évidence que des lymphoblastes de

patients atteints de la maladie de Niemann-Pick résistent à l'apoptose induite par un anti-CD95 agoniste et que l'addition de céramide exogènes ou d'une aSMase avec un résidu mannose au milieu de culture permet de restaurer la sensibilité de ces cellules (De Maria *et al.*, 1998). De plus, les lymphoblastes des malades n'accumulaient pas non plus de ganglioside GD3, un sphingolipide proposé par ce même groupe comme médiateur de la mort induite par le céramide et par CD95L (De Maria, 1997). Il a également été mis en évidence que le GM3 et le GM1 peuvent interagir avec la caspase-8 après stimulation de cellules lymphoblastiques CEM par un anti-CD95 agoniste et que le démantèlement des radeaux lipidiques riches en glycosphingolipides par la méthyl- β cyclodextrine inhibait la mort dépendante de CD95 (Garofalo, 2002).

Le rôle de la aSMase dans l'induction de mort par CD95L a toutefois été remis en cause. En effet, un groupe a mis en évidence que des cellules lymphoïdes de patients atteints de la maladie de Niemann-Pick étaient tout aussi sensibles à l'apoptose médiée par CD95 que les mêmes cellules corrigées pour réexprimer la aSMase. L'augmentation lente de céramide observée en réponse à CD95L était similaire dans les deux types de cellules, confirmant que cette augmentation n'était pas dépendante de la SMase acide (Cock *et al.*, 1998). De plus, une étude du groupe de Thierry Levade, menée sur plusieurs lignées cellulaires issues de plusieurs patients atteints de la maladie de Niemann Pick de type A ou B, indique que la aSMase n'est pas nécessaire à la production de céramide et à l'apoptose induite par un anticorps agoniste anti-CD95, mais également en réponse aux anthracyclines et à l'irradiation (Bezombes *et al.*, 2001). Enfin, ceci a également été confirmé par une étude menée par l'équipe de Douglas Green, qui montre que les thymocytes ainsi que les cellules T et B activées de souris déficientes en aSMase présentent une sensibilité normale à la mort dépendante de CD95 (Lin *et al.*, 2000). Comme l'indique cette même étude, l'importance de la aSMase pourrait dépendre du type cellulaire. Ainsi, les souris aSMase KO ne présentent pas d'hépatotoxicité en réponse à un anti-CD95 agoniste, contrairement aux souris sauvages (Lin *et al.*, 2000).

Concernant l'éventuelle implication du GM3 et d'autres gangliosides dans la mort induite par CD95L, ceci reste actuellement discuté. Ainsi, alors que les travaux du groupe de Roberto Testi ont initialement suggéré que la production de GD3, successive à l'activation d'une aSMase, était nécessaire à la mort dépendante de CD95, il a récemment été montré que plusieurs gangliosides, et pas seulement le GD3, étaient produit en réponse à la stimulation de CD95 et que ce phénomène ne dépendait pas de l'activation de la aSMase (Popa *et al.*, 2011). De plus, l'inhibition de la synthèse de glucosylcéramide, précurseur de nombreux

gangliosides, n'a pas d'impact sur cette apoptose (Popa *et al.*, 2011). Par ailleurs, une étude indique que la surexpression de la GCS dans des cellules Jurkat ne permet pas de contrecarrer l'accumulation de céramide issu de la dégradation de la SM induite par la stimulation de CD95 (mais également par l'étoposide ou l'irradiation), probablement en raison d'une différence de localisation subcellulaire entre le lieu de génération du céramide par l'action des SMases et la GCS (Tepper, 2000).

L'implication d'une sphingomyélinase neutre dans l'apoptose induite par CD95L a également été proposée mais ceci reste controversé. Plusieurs études menées par Jannie Borst et Wim J Van Blitterswijk ont suggéré que l'accumulation de céramide observée dans les cellules sensibles était un évènement assez tardif, ayant lieu de façon concomitante à l'apparition de marqueurs morphologiques de l'apoptose et liée à l'activation d'une sphingomyélinase neutre (Tepper *et al.*, 1995). L'accumulation tardive de céramide induite par CD95L serait majoritairement indépendante de l'activité des caspases effectrices mais dépendrait de l'activation de la caspase 8 (Tepper *et al.*, 1997 ; Tepper *et al.*, 1999). Ce groupe a suggéré que la SM, majoritairement sur le feuillet externe de la membrane plasmique, pourrait subir une translocation vers le feuillet interne, en parallèle à la translocation inverse de la phosphatidylsérine, permettant son accessibilité à une sphingomyélinase cytosolique (Tepper *et al.*, 2000). La SMase neutre impliquée dans cette accumulation tardive de céramide n'a toutefois pas encore été clairement identifiée.

Une étude récente a mis en évidence que le facteur de transcription IRF8, dont l'expression est fréquemment perdue dans les cellules hématopoïétiques de patients souffrant de leucémie myéloïde chronique, réprime la transcription de la céramidase acide (Hu *et al.*, 2011). Dans cette étude, la restauration de l'expression d'IRF8 réprimait donc l'expression de la céramidase acide induisant alors une accumulation de céramide et une sensibilité accrue à la mort induite par CD95L .

II.3.2.2.2 Rôle du céramide dans la réponse à TRAIL et au TNF.

Des élévations de céramide ont été observées dans des cellules sensibles, impliquant également plusieurs enzymes du métabolisme sphingolipidique en réponse à TRAIL. Ainsi, l'équipe d'Erich Gulbins a mis en évidence l'activation, dépendante de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), d'une SMase acide en réponse à TRAIL, nécessaire

à la formation de plateformes enrichies en céramide qui favorisent le clustering de DR5 et l'induction d'apoptose dans différentes lignées cellulaires (Dumitru & Gulbins, 2006). La même équipe a mis en évidence la possibilité de sensibiliser des cellules à l'apoptose induite par TRAIL en traitant les cellules avec de la doxorubicine, mécanisme mettant en jeu l'activation d'une SMase acide (Dumitru *et al.*, 2007). Par ailleurs, des cellules de métastase d'adénocarcinome de colon SW620, résistantes à TRAIL, peuvent être sensibilisées *via* l'ajout de céramide exogène (Voelkel-Johnson *et al.*, 2005). Ces cellules expriment un niveau plus faible de Ceramide Synthase 6 que la lignée de tumeur primaire SW480 correspondante et une augmentation d'expression de cette enzyme dans les SW620 permet de restaurer l'élévation de C16-céramide ainsi que l'apoptose induite par TRAIL (White-Gilbertson *et al.*, 2009). De plus, la surexpression d'une céramidase acide confère une résistance à des cellules de fibrosarcome murin vis-à-vis de la mort caspase-indépendante induite par TRAIL (Thon *et al.*, 2006).

Concernant le TNF, une production de céramide a également été observée, surtout attribuée à l'action d'activité sphingomyélinasique. L'activation d'une SMase acide, potentiellement par clivage activateur par la caspase 7 au sein des endosomes, serait ainsi impliquée dans la mort induite par le TNF (García-Ruiz *et al.*, 2003 ; Schwandner *et al.*, 1998 ; Edelman *et al.*, 2010). La SMase neutre 2 pourrait aussi potentiellement participer à l'apoptose induite par le TNF (Liu *et al.*, 1998 ; Neumeyer *et al.*, 2006). En accord avec cette dernière hypothèse, la protéine adaptatrice FAN (Factor Associated with Neutral sphingomyelinase activation) est impliquée dans l'élévation de céramide et l'apoptose induite par le TNF (Adam-Klages *et al.*, 1996 ; Ségui *et al.*, 2001). La voie de synthèse *de novo* serait également activée en réponse au TNF (Xu *et al.*, 1998) et la surexpression de la GCS dans des MCF-7 aurait un effet protecteur vis-à-vis de la mort induite par le TNF (Liu *et al.*, 1999). Il semblerait ainsi que la réponse au TNF puisse être modifiée par plusieurs enzymes du métabolisme des sphingolipides, ce qui pourrait résulter en plusieurs phases d'augmentation de céramide successives (Bourteele *et al.*, 1998) (cf. chapitre II.4.3).

II.4. Les sphingomyéline synthases

II.4.1. Structure et activité catalytique.

En 2004, deux équipes ont, par des stratégies expérimentales différentes, cloné les gènes codant pour deux isoformes de phosphatidylcholine : céramide choline

phosphotransférase ou sphingomyéline synthases (Huitema *et al.*, 2003 ; Yamaoka *et al.*, 2004). Les SMS1 et 2 catalysent la même réaction chimique. Il s'agit du transfert d'un groupement phosphorylcholine de la phosphatidylcholine sur le céramide, ce qui permet de générer de la SM et du diacylglycérol (Figure 23). Il est à noter que dans certains cas, les SMS possèderaient la capacité de catalyser la réaction inverse (Van Helvoort *et al.*, 1994 ; Albi *et al.*, 2007).

La SMS1 est codée par un gène porté par le bras long du chromosome 10 (locus 10q11.2 qui est également le locus du proto-oncogène RET) possédant au moins 24 exons (Rozhkova *et al.*, 2011). Plusieurs transcrits, résultant d'épissages alternatifs, ont été détectés et leur présence est variable selon le tissu considéré (Rozhkova *et al.*, 2011). Le gène codant pour la SMS2 est situé sur le bras long du chromosome 4 (locus 4q25). La SMS1 est une protéine de 413 acides aminés et la SMS2 en comprend 365. Au niveau tissulaire, ces deux enzymes seraient exprimées de façon ubiquitaire (Huitema *et al.*, 2003 ; Tafesse *et al.*, 2007). Toutefois, le niveau d'activité de synthèse de SM est variable selon le type cellulaire considéré (Kilkus *et al.*, 2008). Au niveau subcellulaire, alors que la SMS1 est localisée au niveau de l'appareil de Golgi, la SMS2 est également retrouvée au niveau de la membrane plasmique (Huitema *et al.*, 2004, Tani et Kuge, 2009). Cette différence majeure de localisation subcellulaire, malgré l'existence d'une forte identité protéique (57%), a été expliquée par la présence de sites de palmitoylation sur la séquence peptidique de la SMS2, permettant son adressage et son association à la membrane plasmique, ces sites étant absents de la séquence peptidique de la SMS1 (Tani et Kuge, 2009). Au niveau structurel, les SMS1 et 2 possèdent 6 domaines transmembranaires supposés (Huitema *et al.*, 2004). Le site catalytique, très conservé entre les différentes espèces (Huitema *et al.*, 2004), est situé dans la lumière trans-golgienne pour la SMS1 et du côté extracellulaire de la membrane plasmique pour la SMS2. Il est constitué de deux histidines et d'un acide aspartique (Yeang *et al.*, 2008). Les SMS possèdent également un domaine SAM (pour Sterile Alpha Motif), qui pourrait participer à l'interaction de ces enzymes avec d'autres protéines, inconnues à ce jour. Certaines études suggèrent également l'existence d'une activité de synthèse de SM au niveau de l'enveloppe nucléaire, voire de la chromatine, suggérant soit, une localisation potentielle des SMS1 et/ou 2 dans ces compartiments, soit l'existence d'une protéine supplémentaire possédant une activité sphingomyéline synthase (Albi & Magni, 1999 ; Watanabe *et al.*, 2004).

Il est à noter que la SMS2 est également capable de catalyser la synthèse de DAG et de céramide phosphoéthanolamine à partir de céramide et de phosphatidyléthanolamine. L'activité phosphoéthanolamine : ceramideethanolaminephosphotransferase est également réalisée par une troisième enzyme, la SMS-r (pour sphingomyelin synthase related protein), qui est localisée au niveau du RE et qui, contrairement aux SMS1 et 2, ne permet pas de générer de la SM *in vitro*. Il est à noter que l'éthanolamine phosphoceramide peut être méthylé en SM (Ternes et al, JLR 2009). L'activité de la SMSr a en particulier été détectée dans des fractions membranaires de foie et de cerveau de rat, mais on ne connaît pas sa contribution réelle à la synthèse *de novo* de SM en général.

II.4.2. Phénotypes des souris déficientes en sphingomyéline synthases.

Des souris KO pour la SMS2 ont été générées. Ces animaux sont viables et ne présentent pas de modifications phénotypiques particulières (Hailemariam *et al.*, 2008). Une étude récente indique que ces animaux sont moins enclins au développement d'une inflammation et d'un œdème pulmonaire induits par le LPS que des souris sauvages (Gowda *et al.*, 2011). De façon intéressante, des souris SMS1 KO présentent un phénotype particulier, avec une mortalité néonatale accrue, une réduction du poids corporel et une masse grasse diminuée (Yano *et al.*, 2010). Les îlots pancréatiques de ces souris présentent une altération de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Les auteurs de cette étude indiquent que ce défaut de sécrétion pourrait être liée à un dysfonctionnement mitochondrial au sein de ces cellules, dépendant d'une accumulation de ROS (espèces réactives de l'oxygène). Aucun animal doublement déficient pour la SMS1 et la SMS2 n'a été décrit à ce jour qui, selon des résultats non publiés, ne seraient pas viables.

II.4.3 Régulation de l'activité sphingomyéline synthase.

L'activité de synthèse de SM par les SMS est modifiée en réponse à plusieurs signaux physiologiques, notamment des signaux de stress cellulaire et dans certaines conditions physio-pathologiques.

Deux études suggèrent que l'acquisition de caractéristiques cancéreuses dans certaines cellules pourrait être associée à une élévation de l'activité de synthèse de SM. Une première

étude suggère que la transformation cellulaire peut, dans certains cas, s'accompagner d'une modulation de l'activité de synthèse de SM. En effet, il a été décrit que la transformation de fibroblastes humains pulmonaires WI38 par l'antigène T de SV40 s'accompagnait d'une diminution du taux de céramide et d'une élévation de l'activité SMS (Luberto & Hannun, 1998). Il a également été mis en évidence par une équipe japonaise que des cellules HL-60 résistantes à la doxorubicine présentaient des activités SMS et GCS significativement augmentées en comparaison avec les cellules contrôles. De plus, dans cette même étude, les auteurs ont mis en évidence que des cellules chimiorésistantes de patients atteints de leucémies de divers types présentaient une réduction du taux de céramide accompagnée d'une élévation des activités SMS et GCS (Itoh *et al.*, 2003).

Certaines conditions de stress cellulaires induisent à l'inverse une inhibition de l'activité SMS. Cette inhibition peut être un phénomène direct, impliquant une diminution de l'activité enzymatique des SMS elles-mêmes, et/ou étant la résultante de modification de la disponibilité des substrats de ces enzymes, notamment *via* une modulation de l'activité ou de la localisation de CERT.

L'irradiation UVB de kératinocytes s'accompagne d'une inhibition de synthèse de la SM, en partie induite par une diminution de la liaison du céramide par CERT, et donc de son transport du RE vers l'appareil de Golgi, en raison d'une homo-trimérisation inhibitrice UVB-induite de CERT (Charruyer *et al.*, 2008). La fonction de CERT peut également être modulée par phosphorylation, ce qui module aussi l'activité de synthèse de SM. Ainsi, la phosphorylation de CERT diminue sa capacité de transport du céramide du RE vers l'appareil de Golgi. De façon surprenante, il a été mis en évidence que cette phosphorylation peut être induite par traitement des cellules avec une SMase bactérienne exogène, qui induit donc une hydrolyse de la SM du feuillet externe de la membrane plasmique, ou par de la méthyl- β -cyclodextrine qui induit un démantèlement des radeaux lipidiques (Kumagai *et al.*, 2007). De façon intéressante, il a également été mis en évidence que la phosphorylation de CERT pouvait être réalisée par la protéine kinase D, une protéine recrutée au niveau de l'appareil de Golgi de façon DAG-dépendante, ce qui pourrait ainsi constituer un mécanisme de retro-control négatif de synthèse de SM (Fugmann *et al.*, 2007). Par ailleurs, des perturbations de la morphologie de l'appareil de Golgi induisent une inhibition de l'activité de synthèse de SM liée à une diminution de la localisation de CERT au niveau Golgien (Chandran & Machamer, 2008). Des protéines Golgiennes pourraient également influencer la synthèse de SM. Par

exemple, une étude suggère qu'une déficience en complexe COG (Conserved Oligomeric Golgi complex), responsable du trafic rétrograde d'enzymes golgiennes, diminue la synthèse de SM en diminuant la colocalisation entre CERT et la SMS1 (Spesott, et al, 2010).

Plusieurs autres stress pourraient moduler l'activité de synthèse de SM. Il a été mis en évidence que l'apoptose induite par le TNF dans des cellules de rhabdomyosarcome est précédée par une élévation multiphasique du taux de céramide dont la première phase (correspondant aux premières minutes post-stimulation) est à la fois associée à une augmentation de l'activité SMase neutre et à une inhibition des activités de synthèse de GlcCer et de SM (Bourteele *et al.*, 1998). La seconde phase est associée à une élévation de synthèse *de novo* de céramide, tandis que les activités SMS et GCS augmentent pendant environ une heure avant de revenir à leur niveau basal avant la troisième phase d'augmentation de céramide. Cette dernière est associée à une élévation de l'activité SMase acide. Trois heures après le début de la stimulation, les activités SMS et GCS sont de nouveau inhibées. Cette inhibition est absente en présence de zVAD-fmk suggérant une implication potentielle des caspases dans ce phénomène (Bourteele *et al.*, 1998). Une étude suggère également que l'activité de synthèse de SM soit modifiée en réponse à la stimulation du récepteur CD95. Ainsi, l'équipe de Toshiro Okazaki a mis en évidence une inhibition de l'activité de synthèse de SM et une activation d'une nSMase au niveau nucléaire dans des cellules Jurkat, accompagnées d'une accumulation de céramide et d'une induction de mort cellulaire, suite à leur stimulation par un anticorps agoniste anti-CD95 (Watanabe *et al.*, 2004). Ces phénomènes intranucléaires semblent dépendre de l'activation des caspases effectrices puisqu'ils sont inhibés par le DEVD-CHO, un inhibiteur des caspases effectrices. Toutefois, cette étude n'a pas permis de déterminer l'isoforme de SMS inhibée au sein du noyau ainsi que le mécanisme exact de cette inhibition.

Plusieurs études montrent que le traitement de différentes cellules par photothérapie peut induire une inhibition de la synthèse de SM. Ainsi, le traitement de cellules Jurkat par photothérapie avec la phtalocyanine induit une inhibition de l'activité de synthèse de SM, et de GlcCer, associées à une accumulation de céramide (Separovic *et al.*, 2007 ; Dolgachev, 2004). Une étude a également mis en évidence que le traitement de cellules thyroïdiennes de rat en phase de prolifération par des UV-C en présence de thyrotropine induit une inhibition de l'activité de synthèse de SM, avec une accumulation de céramide et une mort cellulaire par apoptose (Albi *et al.*, 2008).

Enfin, il a également été montré que la diminution de la concentration d'IL-2 dans le milieu de culture de cellules NK (Natural Killer) humaines KHYG-1 inhibait l'activité de synthèse de SM, ce qui s'accompagnait d'une génération de céramide et d'un effet anti-prolifératif (Taguchi *et al.*, 2004).

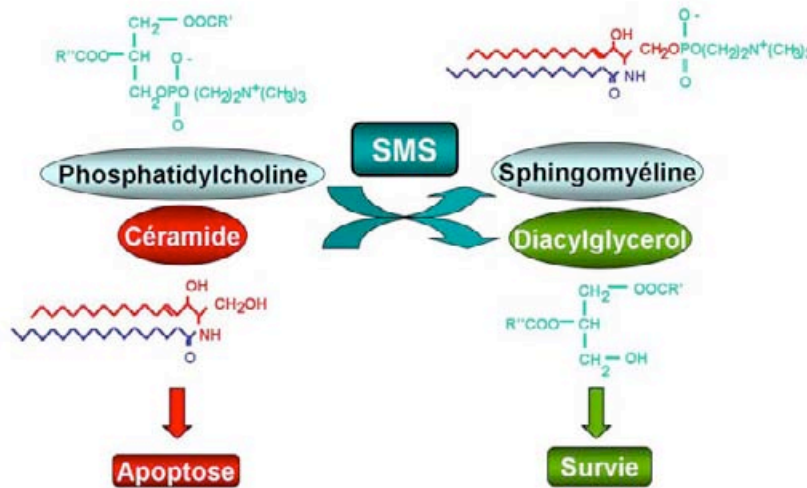


Figure 23 : Réaction catalysée par les SMS1 et 2. Les SMS1 et 2 transfèrent un groupement phosphocholine de la phosphatidylcholine sur le céramide, permettant de générer du DAG et de la SM.

II.4.4 Influence de l'activité SMS sur la survie cellulaire.

II.4.4.1 La synthèse de sphingomyéline favorise la survie cellulaire.

Fonctionnellement, les SMS1 et 2 participent d'une part à la synthèse de SM et d'autre part à la régulation, dans des directions opposées, des taux de céramide et de DAG. La SM est un sphingolipide dont la concentration augmente de la membrane nucléaire vers la membrane plasmique, avec une concentration plus élevée au sein du feuillet externe de la membrane plasmique et plus spécifiquement dans les radeaux lipidiques. Ces rafts jouent un rôle particulièrement important dans les événements membranaires dépendant de la liaison des ligands des DR (cf. chapitre II.3.2.2). La modulation de l'activité de synthèse de SM pourrait d'une part influencer la composition et les propriétés physiques de ces radeaux lipidiques à l'état basal mais également en réponse à un stimulus de stress. Par ailleurs, le céramide et le DAG sont deux lipides bioactifs décrits comme ayant des fonctions opposées vis-à-vis de la survie cellulaire. Le céramide est en effet classiquement considéré comme pro-apoptotique (cf. chapitre II.3.2.1) alors que le DAG favorise la prolifération cellulaire. Des modulations de

l'activité SMS pourraient donc influencer la survie cellulaire en modulant le taux de ces deux lipides (Hampton & Morand, 1989).

Plusieurs études indiquent que le taux cellulaire de DAG n'est en réalité pas modifié par la surexpression ou la diminution de l'expression de la SMS1 ou de la SMS2. Toutefois, une étude montre que seul un pool de DAG au niveau de l'appareil de Golgi est régulé par la SMS1 et dans une moindre mesure, par la SMS2 et ne peut donc être détecté par des méthodes évaluant le taux de DAG cellulaire global (Villani *et al.*, 2008). Cette étude suggère également que ce DAG accumulé au niveau de l'appareil de Golgi par l'activation de la synthèse de SM pourrait servir de plateforme de recrutement de protéines de signalisation comme la PKD (Protein Kinase D)/PKC μ (Villani *et al.*, 2008). De façon intéressante, il a été montré que la surexpression de la PKD inhibe l'induction d'apoptose induite par CD95L (Trauzold *et al.*, 2003). De plus, le DAG lui-même peut s'opposer à l'action du céramide et atténuer ses effets cytotoxiques (Jarvis *et al.*, 1994).

Différentes études indiquent que la modulation de l'expression et/ou de l'activité des SMS1 et/ou 2 pourraient influencer la survie cellulaire en réponse à des stress très divers. Ainsi, l'activité de synthèse de SM favorise la survie cellulaire alors que son inhibition aurait un effet anti-prolifératif. Il a en particulier été décrit que la diminution d'expression des SMS1 ou 2 par interférence à l'ARN dans des cellules carcinomateuses HeLa induit un arrêt de la prolifération cellulaire associé à une élévation du taux de céramide et à une baisse de la SM (Tafesse *et al.*, 2007). Ce phénomène n'est pas reversé par ajout de SM exogène, ce qui suggère que le rôle des SMS ne peut dans ce cas être réduit à la simple synthèse de SM. Par ailleurs, la Jaspine B, un inhibiteur potentiel de la synthèse de SM induit l'apoptose de cellules de mélanome murines et humaines (Salma *et al.*, 2009). Une équipe a mis en évidence la possibilité de moduler la sensibilité de cellules Jurkat vis-à-vis de photosensibilisateurs tels que la phtalocyanine 4 en modifiant l'expression de la SMS1. Ainsi, la surexpression de la SMS1 dans ces cellules les protège vis-à-vis de l'élévation de céramide et de la mort induite par ce traitement (Separovic *et al.*, 2007). L'inhibition de l'expression de la SMS1 ou de la SMS2 permet à l'inverse de les resensibiliser (Separovic *et al.*, 2008). Chez la levure, l'expression ectopique de la SMS1 confère une résistance vis-à-vis de plusieurs stress cellulaires tels que la surexpression de Bax, le peroxyde d'hydrogène, les chocs osmotique et thermique et l'ajout de céramide exogène (Yang *et al.*, 2006). Par ailleurs, la surexpression de la SMS1 dans une lignée cellulaire d'oligodendriogliome humain diminue la

mort induite par la staurosporine (Kilkus *et al.*, 2008), tandis que l'inhibition de CERT, protéine responsable du transport du céramide du RE vers l'appareil de Golgi, confère une résistance vis-à-vis du paclitaxel (Swanton *et al.*, 2007).

L'activité de synthèse de SM pourrait également influencer la signalisation dépendante de récepteurs. Ainsi, dans des cellules Jurkat stimulées par un anti-CD3 et exprimant de façon stable un siRNA dirigé contre la SMS1, le clustering des chaînes de CD3, ainsi que de nombreux événements de signalisation cellulaire sous-jacents pro-prolifératifs sont inhibés (Jin *et al.*, 2008). En outre, l'équipe de Toshiro Okazaki a également montré que le pré-traitement de cellules Jurkat avec du D609, un inhibiteur potentiel de la synthèse de SM induisait une augmentation de l'accumulation de céramide et de la mort cellulaire dépendante de CD95 dans des cellules Jurkat (Watanabe *et al.*, 2004).

Concernant la SMSr, le groupe de Joost C.M Holthuis a mis en évidence que cette enzyme pourrait participer à l'homéostasie cellulaire du céramide (Vacaru *et al.*, 2009). En effet, bien que le céramide phospho éthanolamine soit présent uniquement à l'état de traces dans les cellules de mammifères, l'inhibition de l'activité de la SMSr induit une accumulation de céramide au sein du RE et à un démantèlement de l'architecture de l'appareil sécrétoire, ce qui pourrait avoir des conséquences drastiques sur la survie cellulaire. Les auteurs ont ainsi proposé que cette enzyme soit un détecteur, permettant de réguler la synthèse *de novo* de céramide.

II.4.4.2 La synthèse de sphingomyéline favorise la mort cellulaire.

Une partie de la littérature attribue un rôle pro-apoptotique à la synthèse de SM. Ainsi, Miyaji et ses collaborateurs ont observé qu'une déficience totale en SM dans des cellules de leucémie murine WR19L les rend résistantes à la mort induite par un anticorps agoniste anti-CD95 tandis que la réexpression de la SMS1 dans ces cellules permet la formation de céramide au sein des rafts, augmente la formation du DISC, le clustering de CD95 dans les rafts, et l'activation de la cascade des caspases (Miyaji *et al.*, 2005). Par ailleurs, une étude indique que la déficience totale en SM dans une lignée S49 de lymphome murin confère une résistance vis-à-vis de l'édelfosine, un alky-lyso-phospholipide. Les auteurs suggèrent que l'absence de SM induirait une modification des rafts qui inhiberait la captation de l'édelfosine (van der Luit *et al.*, 2007). Le même groupe a également mis en évidence que ces cellules déficientes en SM résistaient à l'apoptose induite par CD95L, renforçant les observations de

Miyaji et al selon lesquelles la SM membranaire est indispensable à l'induction de l'apoptose dépendante de CD95 (van Blitterswijk *et al.*, 2010). Ces cellules résistantes présentaient également une expression diminuée de la phosphatase SHIP-1 (Alderliesten *et al.*, 2011). Le taux de SM influencerait également la signalisation induite par le TNF. Ainsi, l'inhibition de l'expression de la SMS1 dans des HEK293 inhibe le recrutement du TNFR1 au sein des rafts, son internalisation et l'activation sous-jacente de NFκB après stimulation par le TNF, tandis que la surexpression de la SMS1 ou de la SMS2 dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary), qui s'accompagne d'une élévation d'environ 20% de SM et de 30% de DAG, favorise l'apoptose induite par le TNF (Ding *et al.*, 2007). Par ailleurs, la diminution de l'expression de la SMS1 ou 2 dans des macrophages diminue leur sensibilité vis-à-vis de l'apoptose induite par le LPS (Hailemariam *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'activation de NFκB induite par le LPS est inhibée dans des macrophages issus de souris KO pour la SMS2 (Hailemariam *et al.*, 2008).

III. Objectif général de la thèse.

La liaison des ligands de mort sur les DR induit de multiples événements successifs ou concomitants : des événements membranaires (relocalisation des DR dans les rafts, clustering, internalisation), la formation de complexes protéiques (DISC, complexes I, II, nécrosome, apoptosome), l'activation de protéases (caspases, calpaines, cathepsines), le relargage de facteurs mitochondriaux (cytochrome c, AIF, endoG). Toutes ces étapes sont finement contrôlées et une dysrégulation de l'une ou plusieurs d'entre elles peut mener à l'émergence de pathologies cancéreuses ou lymphoprolifératives. L'objectif général de cette thèse est de clarifier le rôle de certains acteurs moléculaires de ces signalisations cytotoxiques.

L'implication de la caspase 8 dans la signalisation apoptotique de CD95 est largement admise dans la littérature. Des données bibliographiques ainsi que certains travaux de notre équipe indiquent que la caspase 10 serait aussi impliquée dans l'apoptose induite par CD95L. A l'inverse, certains auteurs suggèrent que cette protéine n'a pas de rôle causal dans cette signalisation. Dans la première partie de cette thèse, nous avons cherché à réévaluer le rôle des caspases initiatrices 8 et 10 dans l'apoptose dépendante de CD95. Par ailleurs, nos résultats nous ont amené à étudier le rôle de la caspase 10 dans la mort cellulaire ayant lieu en présence de zVAD-fmk.

Le céramide, physiologiquement accumulé en réponse à divers stress cellulaires, est classiquement considéré comme étant un lipide bioactif en faveur de la mort cellulaire. Plusieurs études indiquent que la modulation de la conversion du céramide en SM pourrait influencer la réponse cellulaire à des stress très divers. Trois études dans la littérature suggèrent que l'activité de synthèse de SM pourrait être modulée et/ou influencer la signalisation dépendante de CD95. Toutefois, les résultats obtenus divergent, certains auteurs accordant un rôle anti-apoptotique à la SMS1 et d'autres auteurs, un rôle pro-apoptotique. Par ailleurs, des résultats préliminaires obtenus au sein de l'équipe indiquent que l'activité de synthèse de SM est inhibée en réponse à CD95L. Nous avons, d'une part, cherché à comprendre le(s) mécanisme(s) de cette inhibition et, d'autre part, évalué l'impact de la modulation de l'activité de synthèse de SM sur la signalisation cytotoxique émanant des TRAILRs et de CD95 ou induite par certaines molécules de chimiothérapie.

MATERIELS ET METHODES

I. Culture et lignées cellulaires.

I-1 Cellules Jurkat.

Différentes lignées leucémiques T humaines Jurkat sont utilisées : la lignée parentale A3 et un clone obtenu par traitement mutagène : I9-2, déficient en caspase-8 (Juo *et al.*, 1998) donnée par le Dr. J. Blenis (Boston, USA). Les sous-populations I9-2a, I9-2b, I9-2c, I9-2d et I9-2e ont été générées au sein du laboratoire, par dilutions limites de la lignée I9-2 (Milhas *et al.*, 2005). La lignée SMS1-KD exprimant de façon stable un siRNA dirigé contre la SMS1 et la lignée contrôle exprimant un siRNA « scramble » ont été données par le Dr. T. Okazaki (Tottori, Japon). Ces lignées Jurkat sont cultivées à 37°C, en atmosphère humide et en présence de 5% de CO₂ dans du milieu RPMI 1640 (+Glutamax) (Invitrogen) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté (Eurobio). Les lignées transfectées sont cultivées en présence de 0,6 mg/ml de G418.

I-2 Cellules HeLa.

Différentes lignées carcinomateuses humaines HeLa sont utilisées : la lignée parentale HeLa WT a été obtenue auprès de l'ATCC. La lignée contrôle pcDNA3.1 a été générée après transfection stable par le plasmide pcDNA3.1 puis sélection. Les lignées HeLa SMS1 et SMS2, qui surexpriment respectivement de façon stable la SMS1 ou la SMS2 ont été générées et fournies par l'équipe du Dr Holthuis (Utrecht, Pays Bas). Les lignées HeLa contrôle II et la lignée HeLa II surexprimant de façon stable la SMS1 ont été générées et fournies par le Dr. O. Micheau (U 866 Inserm, Dijon, France). Les différentes lignées de HeLa sont cultivées dans du milieu DMEM (+ Glutamax) (Gibco) contenant 10% de SVF décomplémenté. Les lignées pcDNA3.1 et SMS1 ont été régulièrement remise sous pression de sélection (G418 0,8 mg/mL). Les lignées HeLa II ont été régulièrement remises sous pression de sélection (puromycine : 2,5 µg/mL).

I.3 Cellules Hct116 et SW480.

Les lignées Hct116 et SW480, de carcinome coliques, surexprimant (SMS1) ou non (cnt) la SMS1 ont été générées et fournies par le Dr O. Micheau. Elles ont régulièrement été

remises sous pression de sélection (puromycine : 2,5 µg/mL). Les cellules SW480 et Hct 116 ont été cultivées à 37°C, en atmosphère humide et en présence de 5% de CO₂ respectivement dans du milieu DMEM (+ Glutamax) (Gibco) ou RPMI 1640 (+Glutamax) (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Eurobio).

II. Transfections cellulaires.

II.1 Transfections transitoires.

Les lignées HeLa ont été transfectées de façon transitoire avec les plasmides pEGFPN1 ou contenant les gènes codant pour la caspase 8 WT étiquetée EGFP ou la caspase 10 WT étiquetée EGFP, fournis par le Dr M. Lénardo (Bethesda, MD). Brièvement, les cellules HeLa WT sontensemencées la veille en plaques 6 puits à 340 000 cellules/puits 24 heures avant la transfection dans du DMEM 10% SVF. Le jour de la transfection, un mélange contenant 500 µL de milieu OPTIMEM (Gibco), 8 µg d'ADN et 20 µL de lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) est incubé à température ambiante pendant 20 min puis ajouté goutte à goutte dans chaque puits contenant 2mL de milieu DMEM 10% SVF, en présence, ou non, de z-VAD-fmk (40 µM). 16 heures après la transfection, les cellules sont incubées en présence, ou non, d'1 µg /mL de CD95L pendant 16h puis analysées par cytométrie en flux après marquage à l'Annexine V-APC (cf. marquage cytométrie).

Pour les transfections transitoires avec des siRNA dirigés contre la SMS1 ou la SMS2, 250000 cellules sontensemencées dans un flacon de culture T25 la veille de la transfection. Le jour de la transfection, 10 µL de siRNA dirigé contre l'ARNm codant pour la SMS1, la SMS2 ou un ARN contrôle (siRNA On target Dharmacon) sont incubés avec 20 µL de réactif de transfection HiPerFect (QIAGEN) et 100 µL de DMEM 0% SVF. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, ce mélange est ajouté goutte à goutte sur les cellules dans le flacon de culture contenant 4 mL de DMEM 10% SVF. Les analyses (western Blot, test de viabilité) sont réalisées 72h après la transfection.

II.2 Transfections stables.

Pour les transfections stables de cellules HeLa avec les plasmides pcDNA3.1 (Invitrogen) ou contenant le gène codant pour la caspase 10 WT étiquetée EGFP, la transfection a été réalisée en utilisant de la lipofectamine 2000 comme décrit ci-dessus. Les

cellules ont ensuite été cultivées en présence de G418 à 0,8 mg/mL (dose évaluée comme létale pour les cellules non transfectées). Pour les cellules exprimant la caspase 10 étiquetée EGFP, une étape supplémentaire de tri cellulaire a été réalisée avec un trieur de cellules FACSARIA -SORP pour générer deux sous populations : les Casp10+, surexprimant de façon stable la caspase 10 étiquetée EGFP et la lignée contrôle Casp10-, ne surexprimant pas la caspase 10 mais résistantes au G418. Les différentes lignées ont été cultivées en présence de G418 à 0,8 mg/mL.

III. Génération des cellules HeLa, Hct116 et SW480 surexprimant la SMS1 de façon stable.

Les lignées HeLa, SW480 et HCT116 sur-exprimant ou non SMS1 ont été obtenues par infection rétrovirale réalisée par l'équipe du Dr Olivier Micheau, suivant le protocole qui suit. L'étape de clonage initiale permettant d'obtenir le plasmide pMSCV-p-SMS1-VSV à partir du plasmide pcDNA3 SMS1-V5 His (obtenu auprès du Dr Holthuis) a également été réalisée par cette équipe. Les virus permettant d'infecter ces lignées cellulaires ont été produits dans les cellules 293-GP2 (Clonotech) par co-transfection du plasmide pMSCV-p-SMS1-VSV contenant l'ADNc de SMS1, du vecteur pVSVG codant pour la protéine virale de la stomatite vésiculeuse. Douze heures après transfection, les cellules sont lavées et placées pendant 12 h dans du milieu DMEM 10 % SVF contenant 50 µM de Butyrate de Sodium puis remises en milieu DMEM 10 % SVF. Après 48 h de production virale, les surnageants de cultures sont collectés et passés sur un filtre d'acétate de cellulose 45 µm. Les cellules cibles sont ensuite placées en présence de ces surnageants viraux pendant 12 h en présence de 8 µg/mL de polybrène. Un deuxième cycle d'infection est réalisé 24 h plus tard. Après 48 h de culture, les cellules cibles sont sélectionnées en présence de 2,5 µg/mL de puromycine (Sigma-Aldrich).

IV. Source de FasL et de TRAIL.

Du FasL humain recombinant (Abcys) a été utilisé pour induire l'activation du récepteur Fas et pour évaluer la toxicité des différents surnageants de culture contenant les différentes formes de FasL produits dans le laboratoire. Alternativement, des surnageants de culture de cellules neuronales murines de type Neuro-2A surexprimant et sécrétant du FasL murin (Neuro2A-FasL) ont été utilisés comme source de FasL (Shimizu *et al.*, 1999). Les

cellules Neuro2A transfectées, ou non, par un plasmide codant pour FasL sont cultivées dans du milieu RPMI 10% SVF. A confluence, les surnageants de culture sont prélevés, filtrés (0,2 µm) et stockés à -20°C. Alternativement, des surnageants de culture de cellules COS transfectées avec un plasmide codant pour IgFasL, une forme de FasL dodécamérique, selon un protocole mis au point par l'équipe du Dr Patrick Legembre (EA-4427, SeRAIC, Rennes). Les surnageants de culture sont prélevés, filtrés (0,2 µm) et stockés à -20°C. Pour les différents FasL produits, des dilutions géométriques de raison 2 de ces surnageants sont effectuées dans du RPMI 10% SVF, pour évaluer la cytotoxicité sur des cellules Jurkat en comparaison avec une gamme de FasL commercialisé (Abcys).

Du TRAIL recombinant humain a été utilisé pour induire l'activation des TRAILRs (Peprtech). Alternativement, du TRAIL étiqueté Histidine (His-TRAIL), produit et fourni par l'équipe du Dr Olivier Micheau a été utilisé.

V. Western Blot.

V.1. Préparation des extraits protéiques.

Les culots cellulaires (1 à 10 millions de cellules) sont repris dans 50 à 200 µL de tampon de lyse (10 mM Hepes-KOH pH 7,4 ; 42 mM KCl ; 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT ; 0,5% CHAPS ; 1 mM PMSF ; 2 µg/mL leupeptine). Après une brève sonication et une centrifugation (10000 rpm, 10 min, à 4°C), les surnageants sont récupérés et les extraits protéiques sont dosés par la technique de Bradford (Biorad). 15 à 50 µg de protéines sont dénaturés par chauffage à 95°C dans du tampon de charge contenant du DTT, du SDS, du glycérol et du bleu de bromophénol puis sont analysés par Western blot.

V.2. Migration électrophorétique des extraits protéiques.

Les échantillons sont déposés sur gel SDS-PAGE (12,5% à 15% de poly-acrylamide). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est incubée dans une solution de saturation (TBS (Tris Buffered Saline)-Tween 0,1%, lait 5%), pendant 1h à température ambiante. La membrane est ensuite incubée à 4°C sur la nuit avec l'anticorps primaire. Puis, après plusieurs étapes de lavage dans du TBS (Tris Buffered Saline)-Tween 0,1%, la membrane est incubée pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (anti-IgG de lapin ou de souris couplés HRP, Cell Signaling) dilué

au 1/3000 dans la solution de saturation. Après plusieurs étapes de lavage (TBS-Tween 0,1%), la révélation est réalisée par chimiluminescence (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific).

VII. Test de viabilité cellulaire.

Les cellules Jurkat sont ensemencées (1 million/mL) dans du RPMI 10% SVF en présence, ou non, de différentes concentrations de cytokines pour les temps indiqués. 100 µL de suspension cellulaire ont été déposés dans chaque puits d'une plaque 96 puits pour une incubation à 37°C. Chaque condition est systématiquement testée en triple. Le MTT (ou Bromure de 3(4,5- diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) (Euromedex) est ajouté dans le milieu de culture à une concentration finale de 500 µg/mL pendant les 2 dernières heures d'incubation à 37°C. Après dissolution des cristaux de formazan formés dans 100 µL d'une solution de solubilisation (HCl 0.01N et SDS 10%) sur la nuit à 37°C, une lecture spectrophotométrique à 560 nm est réalisée. Les densités optiques obtenues sont directement proportionnelles au nombre de cellules vivantes. L'effet cytotoxique des cytokines a été calculé par le pourcentage de viabilité après traitement par les cytokines, par rapport au 100% correspondant aux cellules incubées en absence de cytokines. Pour les cellules adhérentes, l'ensemencement a eu lieu la veille, dans des plaques de 24 puits, à 25000 cellules /puits, dans 1 mL de DMEM (ou RPMI) 10% SVF ou dans des plaques 96 puits, à 5000 cellules dans 100 µL de milieu. Le jour de l'expérience, le milieu a été remplacé par du DMEM 10% SVF en présence, ou non, de différentes concentrations de cytokines ou de molécules de chimiothérapie. Chaque condition a été testée en triple. Comme pour les cellules Jurkat, le MTT a été ajouté 2 h avant l'arrêt de la culture. Le milieu a été retiré et la solubilisation a été faite par ajout de 1 mL de DMSO (ou 100 µL pour les expériences en plaque 96 puits). La lecture et l'analyse des résultats ont été réalisées comme précédemment.

VIII. Tests d'apoptose.

VIII.1. Analyse morphologique.

Pour les analyses de la morphologie nucléaire seule, les cellules adhérentes sont ensemencées en plaque 24 ou 6 puits sur des lamelles de verre la veille et traitées ou non avec l'agent cytotoxique souhaité le jour de l'expérience. Les cellules Jurkat sont ensemencées et traitées sur des lames polylysine (VWR). A la fin de l'incubation, les cellules sont rincées avec du PBS puis incubées 15 min avec une solution froide de PBS (Phosphate Buffer Saline)

contenant 4% de paraformaldéhyde, solution au pH ajusté à 7,4, à température ambiante. Elles sont ensuite rincées puis incubées avec du PBS contenant du Triton X100 (Sigma-Aldrich) 0,1%, pendant 15 min à température ambiante. Les cellules sont rincées puis incubées 5 min en présence de PBS contenant 4 µg/mL de DAPI (Sigma-Aldrich), à température ambiante. Les lamelles sont ensuite montées sur des lames avec du milieu de montage Pro Long Gold anti fade (Invitrogen) et conservées à 4°C avant observation au microscope.

Pour analyser la perméabilisation de la membrane plasmique et la morphologie nucléaire dans la même expérience, après incubation, ou non, avec l'agent cytotoxique testé, les cellules sont incubées pendant 15 min à 37°C et à l'obscurité en présence de 2 µg/ml d'iodure de propidium (Sigma-Aldrich) qui marque uniquement l'ADN des cellules présentant une perméabilisation de la membrane plasmique (caractéristique des cellules en nécrose primaire ou en nécrose post-apoptotique) et 2,5 µM de Syto13 (Molecular Probes), une sonde perméante qui fixe les acides nucléiques, et qui colore donc le noyau et le cytoplasme des cellules. Les cellules sont ensuite observées au microscope à fluorescence inversé et la morphologie est évaluée pour 300 cellules par condition, en distinguant : les cellules viables qui présentent un marquage au Syto13 avec un noyau sans modification morphologique ; les cellules en apoptose : marquées au Syto13 avec un noyau condensées ou fragmentés ; les cellules en nécrose : cellules IP positives.

VIII.2 Analyse du relargage du cytochrome c.

Après traitement en présence, ou non, de l'agent cytotoxique testé, les cellules sont fixées et perméabilisées selon le protocole décrit ci-dessus. Une étape de saturation est réalisée en incubant les cellules pendant 30 min en présence de PBS 10% SVF à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées en présence d'un anticorps anti-cytochrome c, clone 6H2.B4, (BD Biosciences), dilué au 1/500 dans du PBS, pendant une heure à température ambiante. Les cellules sont rincées au PBS 3 fois puis incubées avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé Alexa 488 (Invitrogen) dilué au 1/500^o pendant une heure à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées, marquées au DAPI (cf. ci-dessus) et les lamelles sont montées comme décrit précédemment. Le pourcentage de cellules présentant un relargage du cytochrome c est évalué par observation et comptage d'au moins 300 cellules par condition, en distinguant les cellules présentant un réseau mitochondrial clairement défini des cellules présentant un marquage diffus du cytochrome c.

VIII.3. Analyse de l'externalisation des phosphatidylsérines et de la perméabilisation de la membrane plasmique par cytométrie de flux.

Une évaluation du type de mort cellulaire est réalisée après marquage des cellules par l'Annexine V-FITC (ou APC) et l'iodure de propidium (IP) (Immunotech Beckman Coulter). Les cellules sont centrifugées et incubées 10 minutes à 4°C en présence d'Annexine-V-FITC (ou APC) (250 ng/ml) et d'IP (50 ng/ml) avant d'être analysées par cytométrie en flux, en analysant au minimum 10000 événements. Le pourcentage de cellules apoptotiques qui présentent une externalisation des phosphatidylsérines, marquées par l'Annexine-V-FITC (ou APC), ainsi que la proportion de cellules nécrosées, marquées par l'IP, sont évalués. Les cellules nécrosées peuvent aussi être marquées par l'Annexine-V-FITC (ou APC). Ainsi, les cellules apoptosées sont Annexine-V + et IP- tandis que les cellules nécrosées (nécrose primaire ou nécrose post-apoptotique) sont Annexine V+ ou – et IP+.

VIII.4. Essais *in vitro* : évaluation du clivage de la SMS1 par les caspases.

200 µg d'extraits protéiques (réalisés selon le protocole décrit en V.1) de cellules HeLa surexprimant la SMS1 ont été incubées avec 3U de caspase recombinante (Abcys) pendant 90 minutes à 37°C. Alternativement, 100 ng de SMS1 recombinante taguée GST (Abnova) sont incubées pendant 90 minutes à 37°C avec 3U de caspases recombinantes actives dans du tampon de lyse (cf. V.1). La réaction est ensuite arrêtée en plaçant les échantillons dans de l'azote liquide, puis un western blot est réalisé sur 50 µg d'extraits protéiques de HeLa SMS1 dans le premier cas, et sur la totalité de l'échantillon dans le second cas.

IX. Analyse des sphingolipides et de leur métabolisme.

IX.1. Extraction lipidique selon la méthode de Folch.

Les culots cellulaires sont repris dans 200 µL d'eau distillée puis, après une brève sonication, 850 µL de chloroforme/méthanol (2 : 1, v/v) sont ajoutés pour procéder à une extraction lipidique. Après avoir vortexé les tubes, une centrifugation (1000 x g, 10 min) est réalisée afin de séparer les phases hydrophobes et aqueuses. La phase hydrophobe, contenant les lipides, est évaporée sous azote.

IX.2. Dosage du céramide et du DAG (méthode utilisant la DAG kinase).

Le principe de la méthode repose sur la capacité de la DAG kinase à phosphoryler le DAG et le céramide respectivement en acide phosphatidique et en céramide-1-phosphate. Les extraits lipidiques sont solubilisés par 40 µl de solution détergente (di-oléoyl-phosphatidyl-glycérol/octyl-β-glucoside), vortexés, soniqués et incubés en présence de DAG Kinase d'E.coli (isolée à partir de bactéries fournies par les Drs. D. Perry et Y.A. Hannun (Charleston, SC)) et d'ATPγP32 (Perkin-Elmer) à température ambiante pendant 30 minutes. La même procédure est réalisée pour établir une gamme de céramide et de DAG. La réaction est stoppée par l'addition de 250 µl d'eau contenant 1% d'acide perchlorique, 400 µl de chloroforme et 400 µl de méthanol. Une centrifugation à 2500 rpm pendant 10 minutes permet d'isoler la phase inférieure contenant le céramide-1-phosphate et l'acide phosphatidique. La phase inférieure est ensuite évaporée sous azote puis solubilisée par 40 µl de chloroforme/méthanol (2:1, v/v). 20 µl de cet extrait sont séparés sur une plaque de silice dans un système de migration contenant chloroforme/acétone/méthanol/acide acétique/eau (50:20:15:10:5, v/v/v/v/v). Les bandes correspondant au céramide-1-phosphate et à l'acide phosphatidique sont révélées par autoradiographie, grattées et comptées par scintillation.

IX.3. Dosage de la sphingomyéline.

Les cellules HeLa,ensemencées à 500000 cellules par T25, sont incubées en présence de [3H]-choline (1µCi/ml) (PerkinElmer) pendant 48 heures pour permettre le marquage de la SM et des PC à l'équilibre. Elles sont ensuite incubées, ou non, en présence de 100 mU/mL de SMase bactérienne (Sigma). La SM et les PC radiomarqués sont ensuite séparés par méthanolyse alcaline. Il est à noter que la SM n'est pas hydrolysée dans ces conditions, contrairement aux PC. Ainsi, après extraction lipidique (cf. chapitre IX.1), les résidus lipidiques sont solubilisés dans 84µl de chloroforme et 84µl de soude méthanolique 0,5 M. Le mélange est incubé à 37°C pendant 2 heures sous agitation et la réaction de méthanolyse est arrêtée par l'ajout de 84µl d'acide chlorhydrique méthanolique (HCl 0,5 M), 144 µl d'eau, 284 µl de chloroforme et 167 µl de chloroforme/méthanol (2 :1, v/v). Après mélange et centrifugation à 2500 rpm pendant 10 minutes, la phase supérieure contenant la glycérophosphocholine marquée est comptée par scintillation. La phase inférieure contenant la SM radioactive est lavée trois fois par une phase supérieure synthétique constituée de

chloroforme/méthanol/eau (3 :48 :47, v/v/v), avant d'être évaporée sous azote et comptée par scintillation liquide.

IX.4. Test d'activité *in situ* et *in vitro* SMS GCS.

IX.4.1. Mesure de l'activité SMS in situ :

Les activités de la SMS et GCS sont évaluées en culture par la quantification de la conversion de C6-NBD-Céramide respectivement en C6-NBD-SM et C6-NBD-GlcCer. La quantité de C6-NBD-céramide converti en C6-NBD-SM et en C6-NBD-GlcCer est respectivement proportionnelle aux activités SMS et GCS. Les cellules sontensemencées la veille (cellules adhérentes) ou le jour même (Jurkat) à 1 million de cellules par T25 (cellules adhérentes) ou à 2 millions de cellules par puits de plaque 6 puits (Jurkat). Le jour de l'expérience, les cellules sont cultivées dans leur milieu de culture classique dépourvu de SVF en présence de 2,5 μM de C6-NBD-Céramide (Invitrogen), un analogue fluorescent du céramide, pendant 2 heures à 37°C. Les cellules ont été récupérées par centrifugation (500 x g, 3 min). Puis on réalise une extraction lipidique selon la méthode de Folch (cf. IX.1). Le résidu lipidique ainsi obtenu est solubilisé dans 30 μL de chloroforme/méthanol (1 : 1, v/v) et les lipides sont séparés par chromatographie sur couche mince. La migration est effectuée dans le mélange chloroforme/méthanol/ammoniaque (70 : 30 : 5, v/v/v). Après révélation sous UV, les bandes correspondantes au C6-NBD-céramide et à la C6-NBD-SM sont solubilisées dans 2 mL de chloroforme/méthanol (1 : 1, v/v) sur la nuit. La quantification est réalisée par spectrofluorimétrie (λ excitation = 470 nm ; λ émission = 530 nm).

IX.4.2. Mesure de l'activité SMS in vitro :

Des culots cellulaires sont réalisés puis repris dans 200 μL d'eau distillée. Après une sonication brève, les protéines sont dosées par la technique de Bradford (Biorad). 100 μg de protéines sont repris dans un volume final de 250 μL avec du tampon de réaction (MgCl_2 (5 mM), MnCl_2 (5 mM), EDTA (1 mM), HEPES (50 mM)). Le mélange est incubé pendant 1 h à 37°C en présence de 250 μL de liposomes contenant 400 μM de PC (Sigma) et 20 μM de C6-NBD-céramide. La réaction est stoppée par ajout de 2,5 mL de chloroforme/méthanol (2 :1, v/v). Après centrifugation (1000 x g, 10 min), la phase hydrophobe est récupérée et évaporée sous azote, puis le même protocole que pour le dosage de l'activité SMS *in situ*, est réalisé.

X Immunocytofluorescence et microscopie confocale : analyse de la localisation des SMS.

Les cellules HeLa, surexprimant, ou non, la SMS1, sont ensemencées la veille du jour de traitement sur des lamelles de verre en plaque 6 puits, à 400 000 cellules/puits. Le jour de l'expérience, les cellules sont pré-traitées en présence, ou non, de 40 μ M de zVAD-fmk pendant une heure, puis incubées pendant 8h en présence, ou non, de 125 ng/mL de FasL. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées selon le protocole décrit précédemment. Pour les cellules HeLa SMS1, elles sont ensuite incubées successivement en présence des anticorps suivant pendant une heure à température ambiante : anticorps primaire anti-GM130, généré chez la chèvre, (Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1/50 dans du PBS ; anticorps secondaire anti-IgG de chèvre, généré chez l'âne, couplé Alexa 488 (Invitrogen) et dilué au 1/500 dans du PBS ; anticorps primaire anti-V5 (Invitrogen), généré chez la souris, dilué au 1/200 dans du PBS ; anticorps secondaire anti-IgG de souris généré chez la chèvre couplé Alexa 633 (Invitrogen). Alternativement, les cellules HeLa SMS1 ou HeLa cnt (pcDNA3.1) sont marquées avec un anticorps primaire dirigé contre la SMS1 (Exalpha) dilué au 1/50, généré chez le lapin et un anticorps secondaire anti-IgG de lapin généré chez le poulet et couplé Alexa 647 (Invitrogen). Chaque étape d'incubation est suivie de trois lavages avec du PBS. Les cellules sont ensuite incubées avec du DAPI, comme décrit précédemment, et les lamelles sont montées sur des lames. L'observation est réalisée au microscope confocal Zeiss 510 avec un objectif à huile X 63.

XI. Test de clonogénicité en agar.

Les tests de clonogénicité en agar sont réalisés dans des plaques 6 puits. La veille de l'ensemencement cellulaire, une première couche de 2 mL milieu de culture adéquat (RPMI ou DMEM) contenant 10% de SVF, de la pénicilline, de la streptomycine (Gibco) et 0,6% d'agar (Sigma) est préparée et les plaques sont conservés à 4°C. Le jour de l'ensemencement, 2 ml de milieu contenant 10% de SVF, 0,3% d'agar, de la pénicilline, de la streptomycine, la concentration voulue d'His-TRAIL et 5000 cellules sont déposés sur la première couche d'agar. Les plaques sont incubées à 37°C sous 5% de CO₂ et 1 mL de milieu contenant, ou non, TRAIL, a été ajouté une fois par semaine. Au bout de 15 jours, les colonies ont été marquées en ajoutant 100 μ L d'une solution de MTT, photographiées et la totalité des colonies marquées a ensuite été comptée.

XII. Anticorps utilisés.

Pour les expériences de western blot : Les anticorps suivants ont été utilisés, dilués en TBS-T 0,1%, lait ou BSA (Albumine de sérum bovin) 5%, selon les recommandations du fabricant : Anti- β -actin (généralisé chez le lapin : polyclonal, Cell Signalling, 1/1000, ou, généralisé chez la souris : clone AC-15, Sigma-Aldrich, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anti-SMS1 dirigé contre un peptide dérivé de la SMS1 (généralisé chez le lapin : polyclonal, Exalpha-Servibio, 1/500), anti-caspase-2 (généralisé chez la souris : clone C2, Cell Signaling, 1/1000), anti-caspase 3 (généralisé chez le lapin : clone 8G10, Cell Signaling, 1/1000), anti-caspase-7 (généralisé chez le lapin : polyclonal, Cell Signaling, 1/1000), anti-caspase 8 (Cell Signalling, 1C12, généralisé chez la souris, 1/1000, ou, Alexis, C15, généralisé chez la souris, 1/5000), anti-caspase 9 (généralisé chez le lapin : polyclonal, Cell Signalling, 1/1000), anti-caspase-10 (généralisé chez la souris : clone 4C1, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, MBL), anti-FADD (généralisé chez la souris : clone A66-2, 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BD Biosciences), anti-PARP (généralisé chez le lapin : polyclonal, Cell Signaling, 1/1000), anticorps secondaires anti-immunoglobulines de souris ou de lapin couplées HRP (Horse Radish Peroxydase), Cell Signaling, 1/3000).

Pour les expériences de microscopie : Anti-SMS1 dirigé contre la protéine recombinante pleine taille (Exalpha-Servibio, 1/500), anti-GM130 (Santa Cruz Biotechnology-Tebu, 1/50), anti-V5 monoclonal (Invitrogen, 1/200), anti-cytochrome c (BD Biosciences, 1/500), anticorps secondaires anti-IgG de souris ou de lapin couplés Alexa 488, 633 ou 647 (Invitrogen, 1/500).

RESULTATS

I. Article 1 : La mort caspase-10 dépendante induite par CD95L n'est pas inhibée par l'inhibiteur des caspases zVAD-fmk.

I.1. Contexte de l'article 1 :

CD95L peut induire plusieurs types de mort cellulaires, apoptotique et caspase-dépendante, nécrotique et classiquement considérée comme indépendante des caspases, des morts avec des caractéristiques de nécrose et d'apoptose dont la dépendance vis-à-vis de l'activité des caspases n'est pas clairement définie, voire une mort faisant suite à un processus d'autophagie (cf. chapitres I.2 et I.3 de la revue générale).

La mort apoptotique est initiée par la formation du DISC, complexe protéique recruté au niveau du récepteur CD95 de façon précoce et comprenant la protéine adaptatrice FADD, nécessaire pour l'induction de la signalisation apoptotique, l'inhibiteur c-FLIP ainsi que les caspases 8, 10 et 2. Plusieurs études rapportent l'existence d'une mort dépendante de CD95 en présence de zVAD-fmk, un inhibiteur à large spectre des caspases, ou dans des cellules déficientes en caspase 8. Cette mort dite « indépendante des caspases » impliquerait FADD ainsi que la protéine RIP1 (Matsumura *et al.*, 2000 ; Holler *et al.*, 2000). Alors que le rôle de la caspase 8 en temps que caspase initiatrice dans la signalisation apoptotique de CD95 a été largement décrit et semble définitivement admis, l'importance de la caspase 10 dans ce phénomène reste controversée (cf. chapitre I.2.3.2.1 de la revue générale).

Des clones de cellules Jurkat déficientes en caspase 8 et exprimant différents niveaux de caspase 10 ont été obtenus au sein de l'équipe par dilution limite à partir de la population I9-2 , déficiente en caspase 8 (Juo *et al.*, 1998 ; Milhas *et al.*, 2005). Il est à noter que les différents clones générés au sein de l'équipe et les cellules parentales A3 expriment des niveaux comparables de protéines FADD et RIP1. En 2005, cet outil a permis de mettre en évidence que la caspase 10 semble capable de cliver Bid (Milhas *et al.*, 2005). Par ailleurs, il a été observé que le niveau d'expression de la caspase 10 endogène dans ces différents clones était corrélé à leur niveau de sensibilité à CD95L, suggérant ainsi que, contrairement à certaines données de la littérature, la caspase 10 pouvait bel et bien se substituer à la caspase 8 dans la signalisation apoptotique classique induite par CD95L (Milhas *et al.*, 2005).

Nous avons cherché d'un part, à étudier le rôle de la caspase 10 dans l'apoptose dépendante de CD95 par une stratégie différente et d'autre part à évaluer l'implication de cette caspase dans la mort induite par CD95L en présence de zVAD-fmk. Pour cela, nous avons utilisé deux outils cellulaires différents : les clones dérivés de la population I9-2 précédemment caractérisés, et en particulier le clone I9-2e doublement déficient en caspase 8 et 10. Ces cellules ont été transfectées de façon transitoire pour réexprimer ces caspases. D'autres part, nous avons identifié des cellules HeLa n'exprimant pas la caspase 10 endogène. Les cellules HeLa ont également été transfectées de façon transitoire pour induire une expression forte de la caspase 10, mais également de façon stable pour réexprimer la caspase 10 à un niveau faible. Toutes les expériences ont été réalisées avec du CD95L membranaire murin issu de surnageant de cellules Neuro2AFasL ou avec du CD95L dodécamérique (IgFasL) dont l'effet sur les différentes étapes de la signalisation de CD95 est comparable à celui d'un CD95L membranaire (cf. matériels et méthodes).

Caspase-10-Dependent Cell Death in Fas/CD95 Signalling Is Not Abrogated by Caspase Inhibitor zVAD-fmk

Elodie Lafont^{1,2,3}, Delphine Milhas^{1,2}, Justin Teissié⁴, Nicole Therville^{1,2}, Nathalie Andrieu-Abadie^{1,2}, Thierry Levade^{1,2}, Hervé Benoist^{1,2,3}, Bruno Ségui^{1,2,3*}

1 U858 INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), Département Cancer, Equipe 14, Toulouse, France, **2** Institut Fédératif de Recherche 150, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, Toulouse, France, **3** Université Paul Sabatier (Toulouse III), Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Toulouse, France, **4** IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale) Unité Mixte de Recherche 5089 CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), Toulouse, France

Abstract

Background: Upon CD95/Fas ligation, the initiator caspase-8 is known to activate effector caspases leading to apoptosis. In the presence of zVAD-fmk, a broad-spectrum caspase inhibitor, Fas engagement can also trigger an alternative, non-apoptotic caspase-independent form of cell death, which is initiated by RIP1. Controversy exists as to the ability of caspase-10 to mediate cell death in response to FasL (CD95L or CD178). Herein, the role of caspase-10 in FasL-induced cell death has been re-evaluated.

Methodology and Principal Findings: The present study shows that FasL-induced cell death was completely impaired in caspase-8- and caspase-10-doubly deficient (I9-2e) Jurkat leukaemia T-cell lines. Over-expressing of either caspase-8 or caspase-10 in I9-2e cells triggered cell death and restored sensitivity to FasL, further arguing for a role of both initiator caspases in Fas apoptotic signalling. In the presence of zVAD-fmk, FasL triggered an alternative form of cell death similarly in wild-type (A3) and in caspase-8-deficient Jurkat cells expressing endogenous caspase-10 (clone I9-2d). Cell death initiated by Fas stimulation in the presence of zVAD-fmk was abrogated in I9-2e cells as well as in HeLa cells, which did not express endogenous caspase-10, indicating that caspase-10 somewhat participates in this alternative form of cell death. Noteworthy, ectopic expression of caspase-10 in I9-2e and HeLa cells restored the ability of FasL to trigger cell death in the presence of zVAD-fmk. As a matter of fact, FasL-triggered caspase-10 processing still occurred in the presence of zVAD-fmk.

Conclusions and Significance: Altogether, these data provide genetic evidence for the involvement of initiator caspase-10 in FasL-induced cell death and indicate that zVAD-fmk does not abrogate caspase-10 processing and cytotoxicity in Fas signalling. Our study also questions the existence of an alternative caspase-independent cell death pathway in Fas signalling.

Citation: Lafont E, Milhas D, Teissié J, Therville N, Andrieu-Abadie N, et al. (2010) Caspase-10-Dependent Cell Death in Fas/CD95 Signalling Is Not Abrogated by Caspase Inhibitor zVAD-fmk. PLoS ONE 5(10): e13638. doi:10.1371/journal.pone.0013638

Editor: Frederic Rieux-Laucat, INSERM U768, Pavillon Kirrison, France

Received: February 15, 2010; **Accepted:** October 6, 2010; **Published:** October 26, 2010

Copyright: © 2010 Lafont et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by INSERM, Paul Sabatier University, and grant 3417 from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) (to BS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: bruno.segui@inserm.fr

Introduction

Fas (CD95 or Apo-1) is a member of the TNF (tumour necrosis factor) receptor superfamily. Fas plays a crucial function in the regulation of T-cell homeostasis as illustrated by the development of an autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in patients carrying gene mutations affecting Fas signalling [1,2,3]. Upon FasL (CD95L or CD178) challenge, the adaptor protein FADD (Fas-associated protein with death domain) is recruited to the Fas death domain [4]. FADD next interacts with caspase-8 [5] and -10 [6] to form the death-inducing signalling complex (DISC). Oligomerization of caspase-8 and -10 at the DISC level is responsible for the activation of the caspase cascade leading to apoptosis [5,6]. Caspase-8 and -10 cleave and activate effector caspase-3 and -7 [7,8,9], which in turn specifically cleave and inactivate a variety of substrates essential for survival leading to apoptosis [10]. Initiator caspases can trigger an alternative route of

cell death involving mitochondria. This pathway requires the cleavage of Bid (Bcl-2 interacting domain), a pro-apoptotic member of the Bcl-2 superfamily [11,12,13,14]. FasL has also been reported to activate a caspase-independent cell death pathway, leading to necrosis rather than apoptosis [15,16]. This alternative pathway involves FADD and the kinase activity of RIP (receptor-interacting protein), which is recruited to the Fas receptor [15,16].

Caspase-8 and -10 can display non-apoptotic functions in cell signalling [17]. Moreover, initiator caspase-8 and -10 have been previously reported to activate signalling pathways independently of their catalytic activities. For instance, over-expression of the N-terminal part of caspase-8 containing the two death effector domains (DED) but lacking the catalytic site, triggered death-effector filament formation, leading to endogenous caspase activation and apoptosis in HeLa cells [18]. The DED of caspase-8 and -10 can activate NF- κ B in a RIP-dependent

manner [19]. Moreover, a novel caspase-10 isoform lacking the large and small protease subunits, has been recently reported to interact with RIP, activate NF- κ B and induce cell death in the absence of PARP [poly(ADP-Ribose)polymerase] cleavage [20].

Whereas the involvement of caspase-8 in FasL-triggered apoptosis is well established, that of caspase-10 still remains a matter of debate. Indeed, overexpression of caspase-10 complemented caspase-8 deficiency in FasL-treated Jurkat cells in two independent studies [9,21], but not in another [22]. The latter study concluded that caspase-10 is indeed recruited to the DISC in response to TRAIL or FasL but cannot functionally substitute caspase-8 [22].

The present study was undertaken to further evaluate the function of initiator caspase-10 in FasL-induced cell death. Our data demonstrate that (i) FasL-induced cell death is abrogated in caspase-8- and -10-doubly deficient Jurkat cells (I9-2e clone), but not in caspase-8-deficient Jurkat cells expressing caspase-10 (I9-2d clone); (ii) expression of wild-type caspase-10 can restore the ability of FasL to trigger cell death in I9-2e cells; (iii) zVAD-fmk does not impede FasL-induced caspase-10 processing and cytotoxicity.

Results

FasL-induced apoptosis is impaired in Jurkat cells doubly-deficient for caspase-8 and -10

To characterize the Jurkat variants, I9-2a, b, d and e derived from I9-2 cells, the expression of proteins involved in Fas signalling was investigated. As expected from previous observations [13,23], I9-2a, b, d and e cells did not express caspase-8 in contrast to A3 cells. However, FADD, RIP, caspase-2, -9, -3 and -7 (Fig. 1A) and Fas/CD95 (Fig. 1B) were equally expressed in A3 and in the I9-2 variants. Importantly, whereas caspase-10 was expressed in A3, I9-2d cells and, albeit to a lesser extent, I9-2b cells, barely detectable expression of caspase-10 was found in I9-2a and e cells (Fig. 1A). When the different cell variants were incubated in the presence of FasL, toxicity was observed in A3 cells and, albeit to a lesser extent, in I9-2b and I9-2d cells (Fig. 1C). In sharp contrast, FasL-induced cell death was totally abrogated in the caspase-8 and -10-doubly deficient I9-2a and e cells (Fig. 1C). Accordingly, FasL induced caspase activation, as evaluated by the cleavage of the effector caspase substrate Ac-DEVD-AMC and the initiator

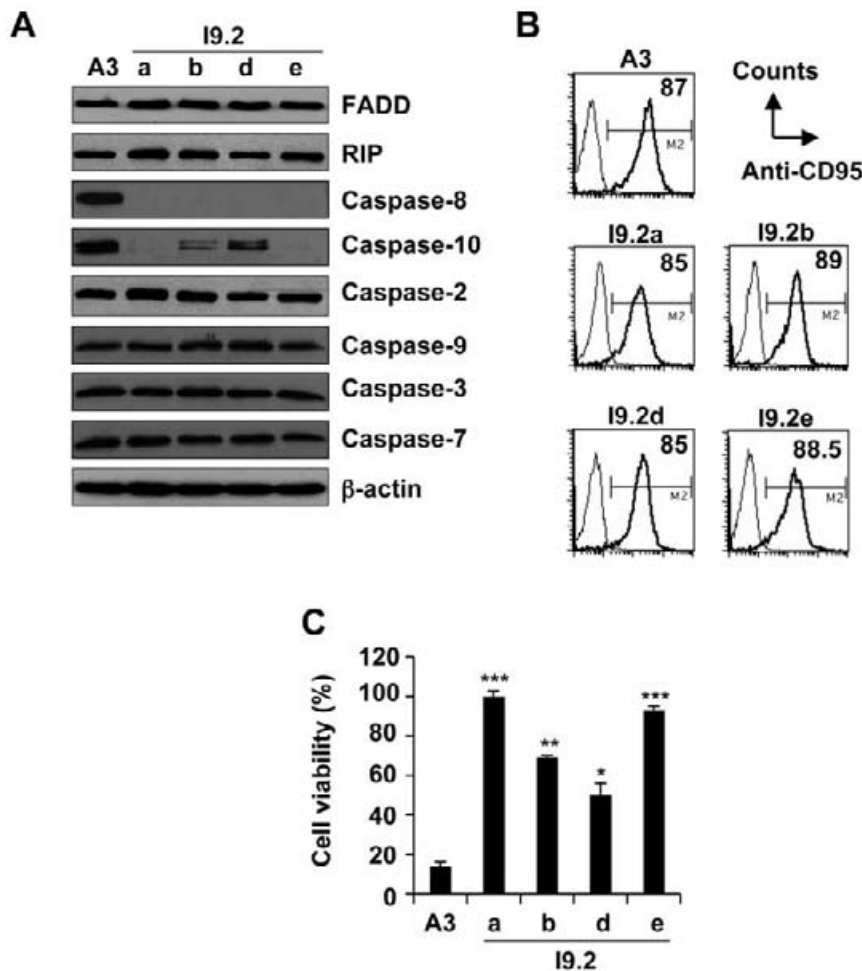


Figure 1. Impairment of FasL-induced cell death in caspase-8 and -10-doubly deficient Jurkat cells. A, 20 μ g total protein extracts from parental (A3) and caspase-8 deficient (I9-2a, b, d and e) Jurkat cell lines were subjected to SDS-PAGE, and Western blotted with anti-caspase-8, -10, -2, -9, -3, -7, anti-FADD, anti-RIP or anti- β -actin antibodies. B, Jurkat cells were labelled with anti-CD95-PE antibody (thick line) or an isotype control (thin line) and analysed by flow cytometry. Percentages of cells expressing CD95 are indicated. C, Jurkat cells were incubated for 8 hours in the presence of 500 ng/mL FasL and cell viability was evaluated by MTT assay. Values are means \pm SEM of three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 as compared to values obtained in A3 cells. doi:10.1371/journal.pone.0013638.g001

caspase substrate Ac-IETD-AMC (Fig. 2A), and apoptosis, as evaluated by flow cytometry (Figs. 2B and C), in A3 cells and, albeit to a lesser extent, in I9-2d cells. FasL totally failed to trigger caspase activation and apoptosis in I9-2e cells (Fig. 2). Identical data have been found using the other caspase-8 and -10-doubly deficient cells (i.e., I9-2a). These data are consistent with our previous study indicating the involvement of both endogenous caspase-8 and -10 in FasL-induced apoptosis [13].

Over-expression of caspase-8 or -10 restores FasL-induced apoptosis in I9-2e cells

Experiments were next restricted to I9-2e cells, which do not express endogenous caspase-8 and -10 (see Fig. 1A and [13]). Over-expression of EGFP, an irrelevant protein in cell death signalling, was used as a negative control to evaluate the basal cytotoxicity induced in our experimental settings. Cells were transfected with plasmids encoding EGFP-tagged wild-type or catalytically inactive caspase-8 (C360S). Alternatively, cells were transfected with a plasmid encoding EGFP-tagged wild-type caspase-10 or co-transfected with plasmids encoding EGFP and untagged catalytically inactive caspase-10 (C401S). Twelve hours post-transfection, cells were further incubated for 4 hours in the presence or absence of FasL (Fig. 3A). Cells were next labelled with annexin-V-APC and analyses were restricted to the EGFP-positive (i.e., transfected) cells. At least 1,000 EGFP-positive cells

were analyzed. As compared to EGFP alone expression, ectopic expression of either wild-type caspase-8 or -10 strongly enhanced annexin-V labelling (Fig. 3B), which was further increased upon FasL treatment (Figs. 3B and C). Annexin-V labelling was slightly increased when cells expressed the catalytically inactive caspase mutants (Fig. 3B). However, mutants failed to significantly sensitize cells to FasL (Fig. 3C). Altogether, our data further indicate that both initiator caspase-8 and -10 are involved in FasL-induced apoptosis.

FasL-induced cell death in the presence of zVAD-fmk is impaired in Jurkat cells doubly deficient for caspase-8 and -10

In wild-type Jurkat cells, FasL-triggered caspase activation was fully abrogated by the addition of 40 μ M zVAD-fmk to the cell culture medium (Fig. 4A). However, cell death, as evaluated both by microscopy (Fig. 4B) and flow cytometry (Fig. 4C) analyses, still occurred in the presence of zVAD-fmk. Microscopic analysis after DAPI staining indicates that, in the absence of zVAD-fmk, FasL elicited apoptosis in A3 cells as illustrated by strong nuclear condensation and/or fragmentation (Fig. 4B). In the presence of zVAD-fmk, dying cells displayed distinct nuclear features such as partial chromatin condensation in the absence of nuclear shrinkage, suggesting that FasL-triggered an alternative form of cell death (Fig. 4B). Flow cytometry experiments indicate that most

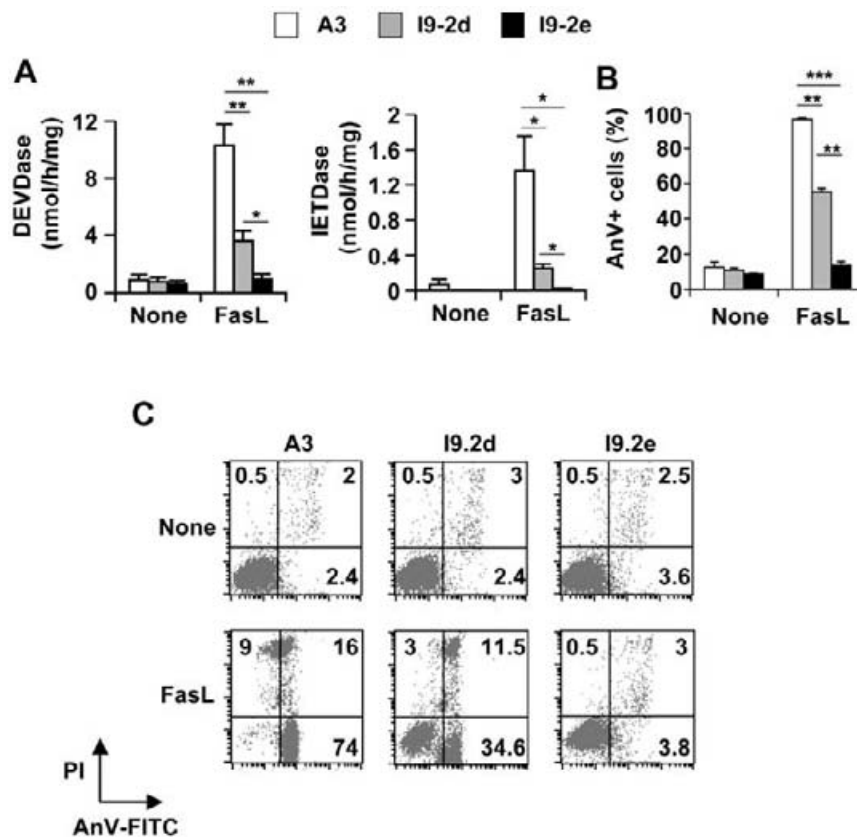


Figure 2. Impairment of FasL-induced caspase activation and apoptosis in caspase-8 and -10-doubly deficient Jurkat cells. **A, B,** A3 (white bars), I9-2d (grey bars) and I9-2e (black bars) Jurkat cells were incubated for 8 hours in the presence or absence of 500 ng/mL FasL as indicated. Caspase activities were assessed using Ac-DEVD-AMC or Ac-IETD-AMC (**A**). Cells were stained with annexin-V-FITC and propidium iodide and analyzed by flow cytometry. Percentages of annexin-V-positive (AnV+) are indicated (**B**). All data are means \pm SEM of three to four independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. **C**, Representative flow cytometry experiment. Low right quadrants: percentages of [AnV-FITC- propidium iodide (PI)-] cells; Up right quadrants: percentages of [AnV-FITC+ PI+] cells; Up left quadrants: percentages of [AnV-FITC- PI-] cells. doi:10.1371/journal.pone.0013638.g002

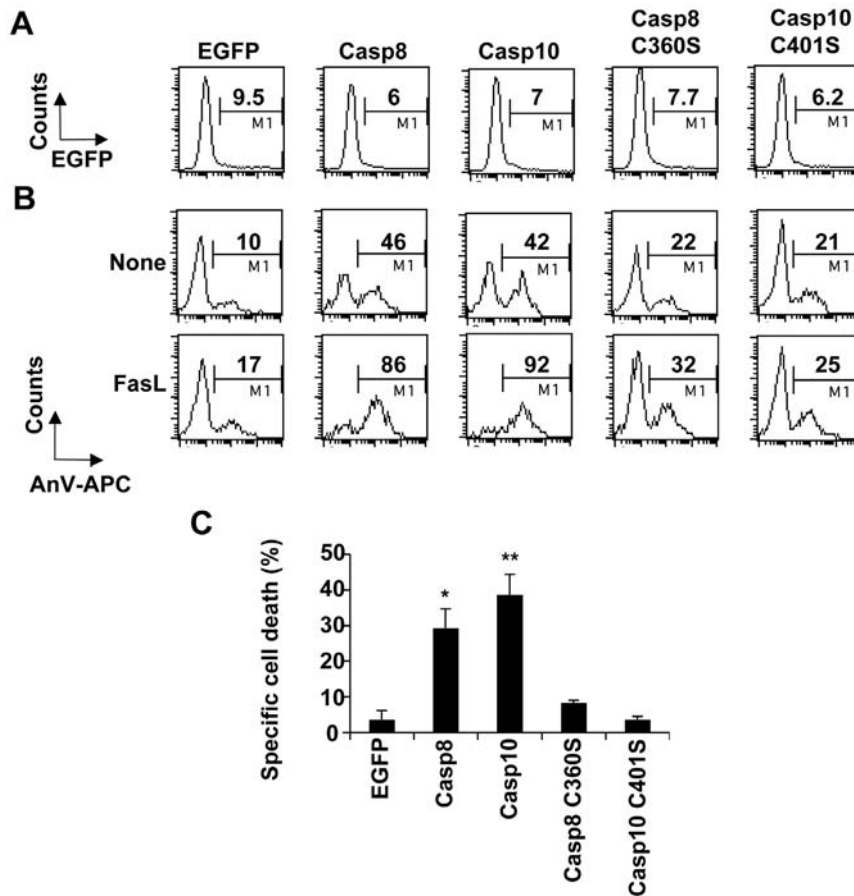


Figure 3. Caspase-8 and -10 can restore FasL-induced apoptosis in caspase-8 and -10-doubly deficient Jurkat cells. **A, B**, I9-2e Jurkat cells were transiently transfected with plasmids encoding EGFP, EGFP-tagged wild-type caspase-8 or -10 or EGFP-tagged catalytically inactive caspase-8 mutant (Casp-8 C360S). Alternatively, cells were co-transfected with plasmids encoding EGFP and catalytically inactive caspase-10 mutant (C401S). Twelve hours post-transfection, cells were further incubated for 4 hours in the presence or absence of 500 ng/mL FasL. Cells were labelled with annexin-V-APC (AnV-APC). EGFP fluorescence was monitored on untreated cells to determine the percentage of transfected cells (A). Analysis of annexin-V binding was restricted to the EGFP-expressing cells on both untreated (None) and FasL-treated (FasL) cells (B). Percentages of fluorescent cells are indicated. Data are from a representative experiment out of three independent experiments. **C**, Specific cell death triggered by FasL was calculated by subtracting basal values obtained in the absence of FasL for each transfection. Data are means \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. doi:10.1371/journal.pone.0013638.g003

of the dead cells were doubly-labelled by annexin-V and propidium iodide (Fig. 4C). Whereas I9-2d cells, which express caspase-10, died to a similar extent as A3 cells in the presence of zVAD-fmk, I9-2e cells remained completely resistant to FasL (Figs. 4B, C and D). Altogether, these results highlight the putative role of endogenous initiator caspase-10 in the form of cell death triggered by FasL in the presence of zVAD-fmk.

Ectopic expression of wild-type caspase-10 restores FasL-induced cell death in zVAD-fmk-treated I9-2e cells

To further evaluate the putative role of initiator caspases in FasL-induced cell death in the presence of zVAD-fmk, wild-type or catalytically inactive caspase-8 or -10 were expressed in I9-2e cells and, immediately after transfection, cells were incubated in the presence of 40 μ M zVAD-fmk. Twelve hours post-transfection, cells were further incubated for 4 hours in the presence or absence of FasL and analysed by flow cytometry (Fig. 5A). Whereas, in the presence of zVAD-fmk, no toxicity was induced by wild-type caspase-8 and caspase mutants, over-expression of wild-type caspase-10 slightly enhanced annexin-V labelling (Fig. 5B). Noteworthy was the finding that over-expression of

caspase-10 restored FasL-induced annexin-V labelling in the presence of zVAD-fmk (Figs. 5B and C). Over-expression of catalytically inactive mutants failed to sensitize cells to FasL under our experimental conditions (Fig. 5C). Altogether, our data provide genetic evidence for the involvement of caspase-10 in FasL-induced cell death in the presence of zVAD-fmk, which was previously defined as “caspase-independent cell death”. Moreover, caspase-10 activity appears to be critical for inducing this form of cell death in response to FasL.

zVAD-fmk does not abrogate caspase-10-triggered apoptosis

To further evaluate the role of caspase-10 in Fas signalling, we attempted to perform Western blot analysis of caspase activation in reconstituted I9-2e Jurkat cells. However, the too low transfection efficiency of Jurkat cells precluded such analyses. We therefore used another cell type, i.e., the HeLa carcinoma cell line, which does express endogenous caspase-8 but not caspase-10 as compared to A3 Jurkat cells (Fig. 6A). HeLa cells could be efficiently transfected, as illustrated by high percentages of EGFP-expressing cells sixteen hours post-transfection with a plasmid

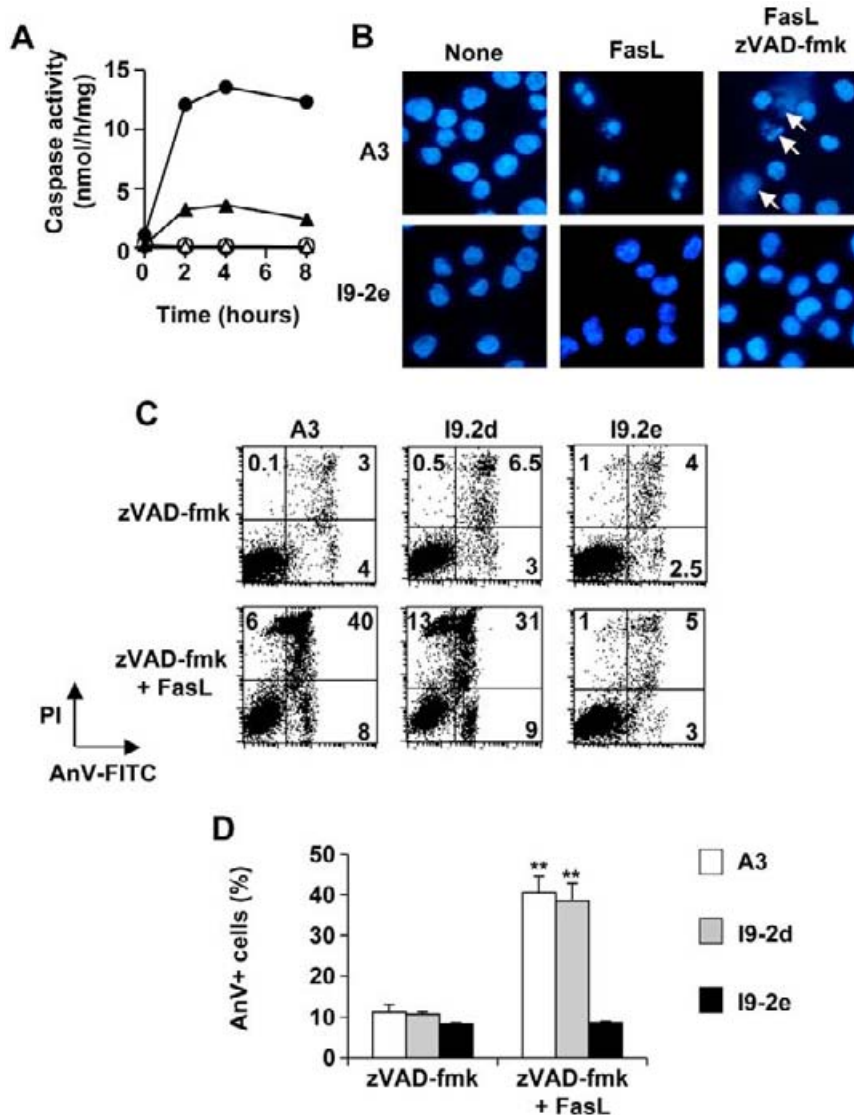


Figure 4. Impairment of FasL-induced cell death in the presence of zVAD-fmk in caspase-8 and -10-doubly deficient Jurkat cells. **A**, A3 cells were incubated for the indicated times with 500 ng/mL FasL in the presence (open symbols) or absence (filled symbols) of 40 μM zVAD-fmk. Caspase activities were assessed using Ac-DEVD-AMC (circles) or Ac-IETD-AMC (triangles). Data are representative of two independent experiments. **B**, A3 and I9-2e cells were incubated for 8 hours in the presence or absence of 500 ng/mL FasL and zVAD-fmk (40 μM) as indicated. Cells were fixed and stained with DAPI before microscopy examination. Arrows indicate cells with partial chromatin condensation. **C**, **D**, A3, I9-2d and I9-2e cells were incubated for 8 hours in the presence of zVAD-fmk (40 μM) with or without 500 ng/mL FasL as indicated. Cells were stained with Annexin-V-FITC (AnV-FITC) and propidium iodide (PI) and analysed by flow cytometry. Representative flow cytometry experiment out of four independent experiments (**C**). Low right quadrants: percentages of [AnV-FITC+ PI-] cells; Up right quadrants: percentages of [AnV-FITC+ PI+] cells; Up left quadrants: percentages of [AnV-FITC- PI+] cells. **D**, Percentages of annexin-V-positive (AnV+) cells (means ± SEM, n=4). **p<0.01. doi:10.1371/journal.pone.0013638.g004

encoding EGFP, EGFP-tagged caspase-8 or -10 (Fig. 6B), allowing caspase expression analysis by Western blot. To evaluate the caspase-inhibitory efficacy of zVAD-fmk under our experimental conditions, HeLa cells were transiently transfected with the different constructs and immediately treated with 40 μM zVAD-fmk and further incubated for 24 hours. During the last 8 hours, 1 μg/mL FasL was added or not to the cell culture medium. In cells transfected with plasmids encoding either EGFP-tagged caspase-8 or -10, an approximately 40 kDa band was revealed with anti-EGFP antibody (Fig. 6C). The appearance of this band did not require FasL treatment and most likely corresponded to the EGFP-tagged small catalytic subunit of pro-caspase-8 and -10, indicating auto-processing of the over-expressed enzymes (Fig. 6C).

The addition of zVAD-fmk led to a different pattern depending on the type of EGFP-tagged initiator caspase expressed. Indeed, the 40 kDa band decreased and accumulated in EGFP-tagged caspase-8 and -10 expressing cells, respectively. In the meantime, whereas EGFP-tagged pro-caspase-8 strongly accumulated, pro-caspase-10 accumulation was less pronounced (Figure 6C).

The consequences on endogenous caspase-9 and PARP cleavage were next analysed under our different experimental conditions. In the absence of zVAD-fmk, caspase-9 processing (i.e., disappearance of pro-caspase-9) occurred upon FasL treatment, this phenomenon being slightly enhanced in EGFP-tagged expressing caspase-8 or -10 cells. The addition of zVAD-fmk fully prevented caspase-9 and PARP cleavage in EGFP and EGFP-

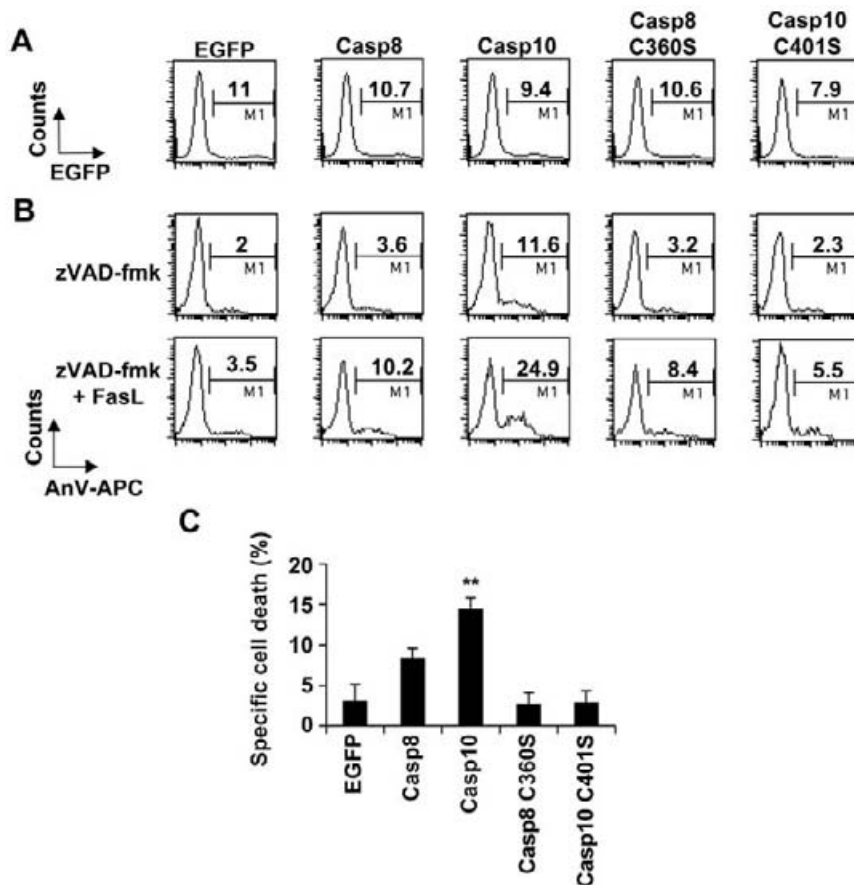


Figure 5. Caspase-10 can restore FasL-induced cell death in the presence of zVAD-fmk in caspase-8 and -10-doubly deficient Jurkat cells. A, B, 19-2e Jurkat cells were transiently transfected as described in the legend to Figure 3 and immediately incubated in the presence of 40 μ M zVAD-fmk. Twelve hours post-transfection, cells were further incubated for 4 hours in the presence or absence of 500 ng/mL FasL. Cells were labelled with annexin-V-APC (AnV). EGFP fluorescence was monitored on untreated cells to determine the percentage of transfected cells (A). Annexin-V binding analysis was restricted to the EGFP-expressing cells on both untreated (None) and FasL-treated (FasL) cells (B). Percentages of fluorescent cells are indicated. Data are from a representative experiment out of three independent experiments. Of note, the present data were obtained in the same experiment depicted in Fig. 3B. C, Specific cell death triggered by FasL was calculated by subtracting basal values obtained in the absence of FasL for each transfection. Data are means \pm SEM of three independent experiments. ** $p < 0.01$. doi:10.1371/journal.pone.0013638.g005

tagged caspase-8 expressing cells. Of particular interest was the finding that caspase-9 and PARP processing was not totally abrogated in EGFP-tagged caspase-10 expressing cells (Fig. 6C). Accordingly, whereas zVAD-fmk completely prevented caspase-8-triggered toxicity, as evaluated by annexin-V labelling, cell death still occurred in caspase-10 over-expressing cells (Fig. 6D).

Collectively, our data indicate that, whereas zVAD-fmk potently prevented caspase-8 auto-processing and pro-apoptotic activity, it had a partial effect on caspase-10 pro-apoptotic signalling in an over-expression system.

zVAD-fmk does not inhibit caspase-10 processing in Fas signalling

We then attempted to stably express caspase-10 in HeLa cells at a physiological level to further evaluate its role in Fas signalling. HeLa cells transfected with a plasmid encoding EGFP-tagged wild-type caspase-10 were cultured under G418 for 45 days. G418-resistant HeLa cells were analysed by flow cytometry and less than 10% of cells expressed EGFP-tagged caspase-10 at low levels (Fig. 7A). Indeed, expression was 3 to 4 times lower in stably than in transiently transfected cells (compare Figs. 6B and 7A). From this heterogeneous cell population, two cell populations were

FACS sorted based on EGFP expression: EGFP-tagged caspase-10 expressing (Casp10+) HeLa cells and their control counterparts (Casp10-), which did not express EGFP at all (Fig. 7B). Those were further grown under G418. This protocol allowed the establishment of Casp10+ HeLa cells, among which 60% of cells stably expressed EGFP-tagged caspase-10 as evaluated by flow cytometry (Fig. 7C). Casp10+ and Casp10- HeLa cells displayed similar CD95, FADD, RIP and caspase-8, -9 and -3 expression as evaluated by Western blot and flow cytometry (Figs. 7C and D). Whereas Casp10+ and Casp10- HeLa cells did not express endogenous caspase-10, Casp10+ HeLa cells expressed exogenous EGFP-tagged caspase-10 at low level as compared to endogenous caspase-10 expression in A3 Jurkat cells (Fig. 7D).

Casp10+ HeLa cells and their control counterparts (Casp10-) were pre-incubated with or without 40 μ M zVAD-fmk for one hour and further incubated in the presence or absence of FasL. Cell morphology analysis indicated that FasL induced apoptosis (i.e., nuclear condensation and/or fragmentation) in both cell lines, caspase-10-proficient cells being slightly, yet not significantly, more sensitive than caspase-10-null cells (Figs. 8A and B). Addition of zVAD-fmk fully prevented FasL-triggered cell death in caspase-10-null HeLa cells. In sharp contrast, apoptotic cell death was not

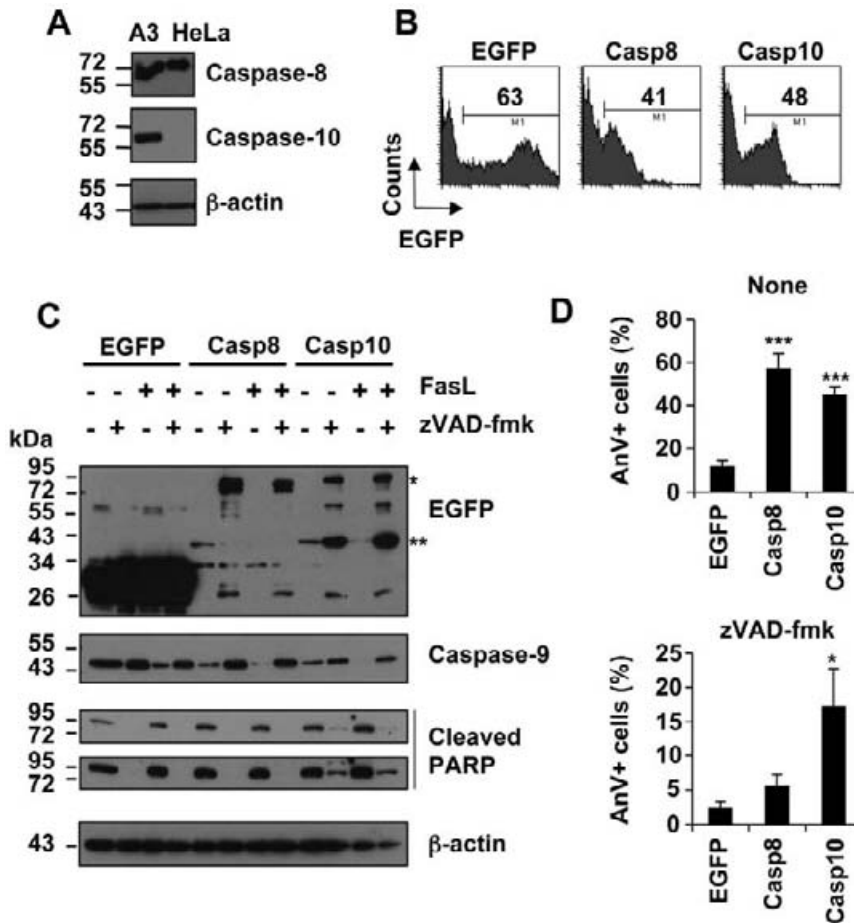


Figure 6. zVAD-fmk does not abrogate over-expressed caspase-10-triggered cell death in HeLa cells. **A**, Total protein extracts derived from wild-type Jurkat (A3) and HeLa cells were analysed by Western blot using anti-caspase-8, anti-caspase-10 or anti β -actin antibodies. **B–D**, HeLa cells were transfected with plasmid encoding EGFP, EGFP-tagged wild-type caspase-8 (Casp8) or -10 (Casp10). **B**, Cells were analysed by flow cytometry 16 hours post-transfection. Values indicated are percentages of EGFP-expressing cells. **C**, Immediately after transfection, 40 μ M zVAD-fmk was added or not to the cell culture medium and cells were further incubated for 24 hours. During the last 8 hours, cells were incubated with or without 1 μ g/mL FasL. Protein extracts were analysed by Western blot using the indicated antibodies. Cleaved PARP expression was analysed at low (up panel) and high (low panel) exposure. (*: EGFP-tagged pro-caspase-8 or 10, **: EGFP-tagged small catalytic caspase-8 or -10 subunit). The \approx 26 kDa band obtained in caspase-8 and -10 expressing cells remains to be characterized. **D**, HeLa cells were transfected and cultured for 24 hours in the presence or absence of zVAD-fmk. Cells were labelled with annexin-V/APC. Annexin-V binding analysis was restricted to the EGFP-expressing cells. Data are means \pm SEM of five independent experiments. *** p <0.001; * p <0.05. doi:10.1371/journal.pone.0013638.g006

completely abrogated by zVAD-fmk in caspase-10-expressing cells (Figs 8A and B). Even at a concentration of 100 μ M, zVAD-fmk failed to abolish cell death in Casp10+ cells (data not shown). Thus, under our experimental conditions, whereas zVAD-fmk efficiently prevented FasL-induced apoptosis in caspase-10-deficient HeLa cells, moderate expression of exogenous caspase-10 overcame, to some extent, the resistance conferred by zVAD-fmk.

Western blot analysis further indicated that, in caspase-10-null cells, FasL triggered endogenous caspase activation, as illustrated by the decrease of pro-caspase-8 and PARP cleavage (Fig. 8C). In contrast, FasL promoted no or little decrease of pro-caspase-8 in caspase-10-expressing HeLa cells. However, EGFP-tagged caspase-10 was efficiently activated as illustrated by the complete loss of pro-caspase-10 expression and the appearance of the 40 kDa band, similar to that observed in transiently transfected cells (see Fig. 6C). PARP was also efficiently cleaved, despite weak endogenous caspase-8 activation (Fig. 8C). This last observation may indicate that EGFP-tagged caspase-10 competes with endogenous caspase-8 to interact with FADD, therefore limiting

the recruitment and activation of endogenous caspase-8 at the DISC level. Interestingly, whereas zVAD-fmk efficiently blocked endogenous caspase-8 and PARP processing, it had no or little effect on EGFP-tagged caspase-10 cleavage (Fig. 8C).

Altogether, our data demonstrate that zVAD-fmk cannot potently prevent caspase-10 processing in Fas signalling, enabling the activation of a caspase-10-dependent alternative cytotoxic signalling pathway in response to FasL.

Discussion

The present observations indicate that the initiator caspase-10 is involved in FasL-induced cell death and the broad-spectrum pancaspase inhibitor zVAD-fmk fails to abrogate caspase-10 activity. Indeed, cell death triggered by FasL was fully impaired in I9-2e (caspase-8 and -10-doubly deficient), but not in I9-2d (caspase-8-deficient but caspase-10-proficient) Jurkat cells. Caspase-10 expression in I9-2e cells restored sensitivity to FasL. Moreover, zVAD-fmk did not abrogate FasL-induced toxicity in

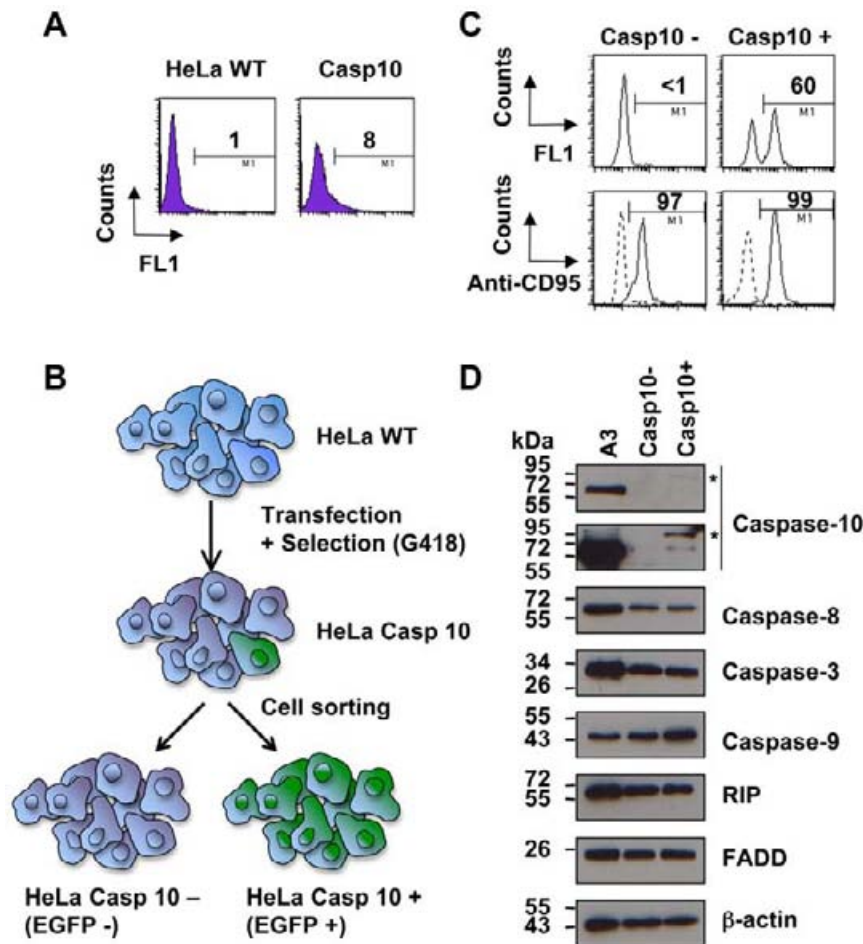


Figure 7. Generation of HeLa cells stably expressing EGFP-tagged wild-type caspase-10 at low level. **A**, HeLa cells were transfected with plasmid encoding EGFP-tagged wild-type caspase-10 and incubated for 45 days in DMEM 10% FCS containing 0.8 mg/mL G418. The whole population of cells (Casp10) were analysed by flow cytometry and untransfected HeLa WT cells were used as negative control to determine the threshold for FL1 channel. Values are percentages of positive cells in FL1 channel. **B**, Scheme for selection of cells expressing (Casp10+) or not (Casp10-) EGFP-tagged caspase-10. **C**, Casp10+ and Casp10- cells were FACS sorted from the heterogeneous population stably expressing caspase-10 and further cultured for one month in DMEM 10% FCS containing 0.8 mg/mL G418 before analysis by flow cytometry for EGFP-tagged caspase-10 and CD95 expression. Values indicated percentages of positive cells in FL1 (up panels) and FL2 (low panels) channels. **D**, Wild-type Jurkat (A3), Casp10+ and Casp10- HeLa cells were analysed by Western blot using the indicated antibodies. Caspase-10 expression was analysed at low (up panel) and high (low panel) exposure. (*: EGFP-tagged pro-caspase-10). doi:10.1371/journal.pone.0013638.g007

Jurkat and HeLa cells expressing caspase-10. Thus, caspase-10 may participate, in addition to the classical pro-apoptotic pathway, to a zVAD-fmk-resistant alternative cytotoxic pathway mediated by FasL.

Wild-type A3 Jurkat cells were highly sensitive to FasL (see Fig. 1C), and dying cells displayed classical features of apoptosis, including increased specific caspase activity (see Figs. 2A and 4A), phosphatidylserine externalisation (see Fig. 2A) and nuclear fragmentation (see Fig. 4B). Whereas caspase-8 and -10-doubly deficient I9-2e cells were fully resistant to FasL-induced caspase activation and apoptosis, caspase-8-deficient I9-2d cells, which expressed caspase-10, displayed an intermediate sensitivity as compared to I9-2e and A3 cells (see Figs. 1C, 2B and C). This was associated with a significant increase in specific caspase activity in I9-2d cells upon treatment by FasL (see Fig. 2A). These data provide genetic evidence that both endogenous initiator caspase-8 and -10 are involved in FasL-induced caspase-dependent cell death. Moreover, genetic correction of I9-2e cells either with EGFP-tagged wild-type caspase-8 or -10 restored FasL-induced

annexin-V labelling, indicating that the resistance of I9-2e cells was unlikely a “clone effect” and further arguing that both initiator caspases are indeed involved in Fas apoptotic signalling. Over-expression of catalytically inactive caspase-8 and -10 in I9-2e cells slightly increased annexin-V labelling but failed to significantly sensitize cells to FasL (see Fig. 3). These findings are in accordance with recent observations indicating that, under some experimental conditions, caspase-8 may induce some cytotoxicity independently of its classical caspase activity [24].

During the last decade, FasL has been reported to trigger a RIP-dependent alternative form of cell death, exhibiting necrotic rather than apoptotic features [15]. This alternative form of cell death was initially defined as a caspase-independent cell death since it occurred in caspase-8-deficient Jurkat cells and was not sensitive to the broad-spectrum caspase inhibitor zVAD-fmk [15]. In accordance with this concept, FasL still triggered some cytotoxicity in A3 cells in the presence of zVAD-fmk (see Fig. 4D). Most of the dying cells were doubly labelled with annexin-V and propidium iodide (see Fig. 4C) and exhibited chromatin alterations with no

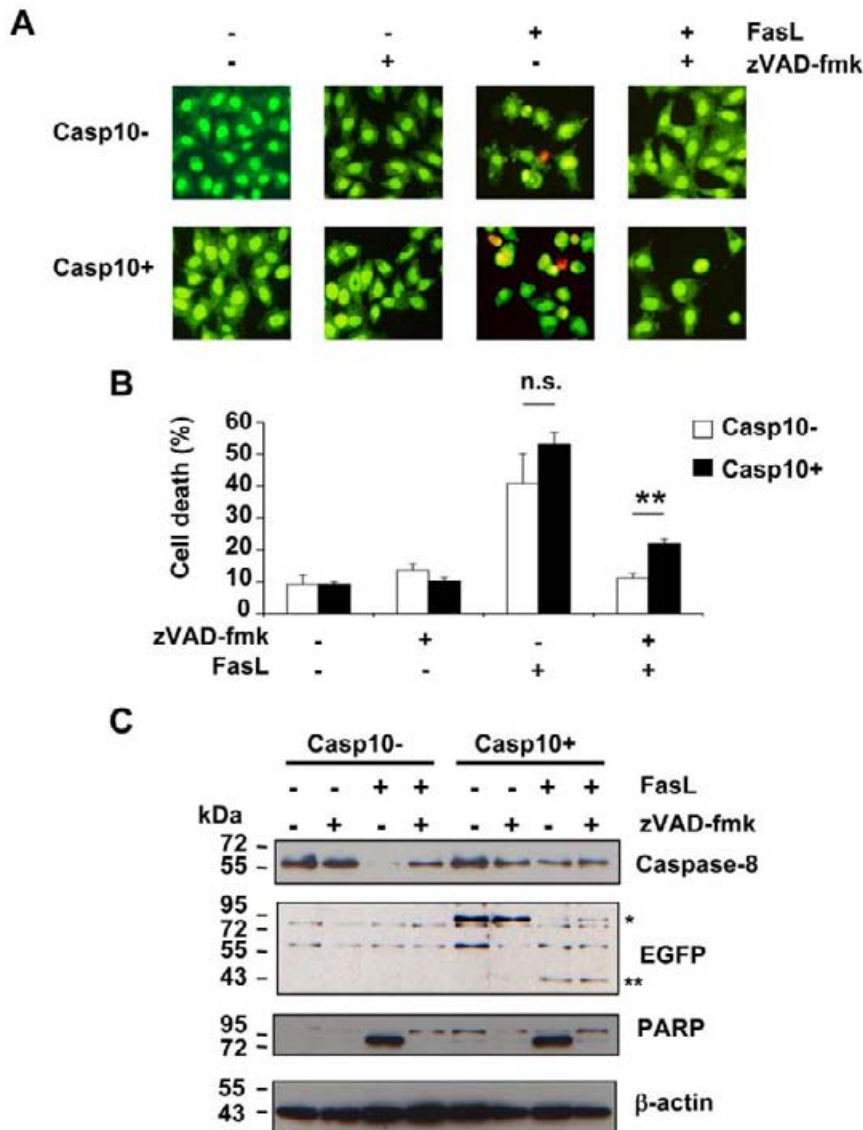


Figure 8. zVAD-fmk does not totally abrogate FasL-triggered apoptosis in HeLa cells expressing caspase-10 at low level. **A, B**, Casp10⁻ and Casp10⁺ HeLa cells were incubated in the presence or absence of 40 μ M zVAD-fmk for 1 hour and further incubated for 16 hours with or without 1 μ g/mL FasL as indicated. Cells were labelled with Syto13 and propidium iodide before fluorescence microscopy examination (A). Of note, less than 5% of the cells were stained by propidium iodide under all conditions indicating that FasL-induced necrosis was marginal in HeLa cells. Percentages of cell death (i.e., cells exhibiting nuclear fragmentation and/or condensation) were determined by analysing at least 500 cells for each condition. Values are means \pm SEM of three independent experiments (n.s.: not significant; ** $p < 0.01$). (B). C, Casp10⁺ and Casp10⁻ HeLa cells were incubated in the presence or absence of 40 μ M zVAD-fmk for 1 hour and further incubated for 8 hours with or without 1 μ g/mL FasL as indicated. Western blot analysis was performed using the indicated antibodies. (*: EGFP-tagged pro-caspase-10, **: EGFP-tagged small catalytic caspase-10 subunit). doi:10.1371/journal.pone.0013638.g008

nuclear shrinkage (see Fig. 4B), suggesting that the cells underwent apoptosis-like or necrosis-like cell death in response to FasL. Of particular interest was the finding that endogenous caspase-10 was likely involved in this FasL-induced alternative form of cell death. Indeed, FasL was unable to kill cells in the presence of zVAD-fmk in two different caspase-8 and -10-doubly deficient Jurkat clones (i.e., I9-2e and I9-2a) (see Fig. 4 and data not shown) as well as in HeLa cells, which did not express endogenous caspase-10 (see Fig. 8). In marked contrast, I9-2d (i.e., caspase-8-deficient but caspase-10-proficient) and wild-type A3 Jurkat cells were equally sensitive towards the combination of FasL and zVAD-fmk (see Fig. 4). Genetic correction of I9-2e cells with a plasmid encoding EGFP-tagged caspase-10, but not caspase-8, restored FasL-induced cell death in the presence of zVAD-fmk (see Fig. 5),

further arguing for a role of caspase-10 in FasL-induced alternative form of cell death. Caspase-10 activity was required for its ability to mediate cell death since the expression of a catalytically inactive caspase-10 (C401S) had no cytotoxic effect. In addition, FasL-induced cell death was not totally abrogated by zVAD-fmk in HeLa cells stably expressing caspase-10 at low level (see Fig. 8).

The broad-spectrum caspase inhibitor zVAD-fmk is commonly used to study the role of caspases in cell signalling. However, our findings show that zVAD-fmk is not potent enough to fully inhibit caspase-10-mediated cytotoxicity. Accordingly, caspase-10 processing in Fas signalling still occurred in the presence of zVAD-fmk (see Figs. 6 and 8). Therefore, in the presence of zVAD-fmk, the residual protease caspase-10 activity likely promotes an

alternative route of cell death, leading to apoptosis-like cell death. Thus, experiments based on the use of zVAD-fmk to study the caspase-independent pathway should be interpreted with caution. Moreover, our study challenges the existence of an alternative caspase-independent cell death pathway in Fas signalling.

The previously so-called “caspase-independent cell death” triggered by death receptors has been reported to be RIP-dependent [15]. One should note that FasL-induced caspase-dependent apoptosis was slightly, yet significantly, reduced in RIP-deficient Jurkat cells [25]. Thus, we cannot rule out the possibility that RIP may functionally interact with caspase-10 to mediate the activation of an alternative cell death. This hypothesis is strengthened by the observation that FADD was required for FasL-induced cell death in the presence of zVAD-fmk [15]. Indeed, whereas FADD deficiency in Jurkat cells did not impair RIP recruitment to Fas/CD95 in response to FasL, FADD-deficient Jurkat cells were fully resistant to both FasL-induced apoptosis and “caspase-independent cell death” [15]. Different groups have previously reported that FADD, besides its capacity to activate the classical caspase cascade activation, may also trigger a non-apoptotic form of cell death [26,27,28,29,30]. Interestingly, this non-apoptotic form of cell death occurred in normal but not in prostate cancer epithelial cells, indicating that this alternative pathway initiated by FADD may be disrupted in some cancer cells [29].

Mutations affecting Fas, FasL, caspase-8 or -10 may be responsible for ALPS or malignancies [2,31,32]. It is tempting to speculate that some mutations may affect the caspase-10-dependent cell death pathway, thereby contributing to FasL resistance in ALPS or in malignant diseases.

Materials and Methods

Reagents

Final concentrations or dilutions of the following reagents are indicated: zVAD(OMe)-fmk (40 μ M) was from Bachem (Voisins-Le-Bretonneux, France); monoclonal anti-FADD (clone A66-2; 0.5 μ g/mL), anti-RIP (clone G322-2, 0.25 μ g/mL) and anti-caspase-8 (clone B9-2; 0.5 μ g/mL) antibodies were from BD Biosciences (Le Pont-de-Claix, France); monoclonal anti-caspase-10 (clone 4C1; 1 μ g/mL) was from MBL (Meudon, France); polyclonal anti-caspase-3 (10 μ g/mL) was from Dako (Trappes, France); monoclonal anti-caspase-2 (clone C2) and polyclonal anti-caspase-7, anti-caspase-9, anti-PARP and anti-Bid antibodies were from Cell Signaling Technology (Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and used at 1/1000 dilution; monoclonal anti- β -actin (clone AC-15; 5 μ g/mL) was from Sigma (Saint-Quentin-Fallaivier, France); monoclonal anti-CD95 (clone 7C11; 1/5 dilution) and IgM irrelevant antibody (10 μ g/mL) coupled to phycoerythrin (PE) were purchased from Immunotech (Marseille, France) and Santa Cruz (Le-Perray-en-Yvelines, France), respectively. cDNAs encoding wild-type and catalytically inactive mutant caspase-8 (C360S) and wild-type caspase-10 [21] were subcloned into pEGFP.N1 plasmids. Catalytically inactive mutant caspase-10 (C401S) cDNA [21] was subcloned into pCiNeo plasmid. Plasmids were kindly given by Dr. M. Lenardo (Bethesda, MD). Mouse FasL produced in the culture medium of Neuro-2A cells stably transfected with a plasmid encoding FasL was used at a final concentration of 500 ng/mL [13,33]. Alternatively, human FasL kindly provided by Dr. P. Legembre (EA 4427 SeRAIC, Rennes University, France) was used at a final concentration of 1 μ g/mL.

Cell lines

Parental Jurkat T leukaemia cells (clone A3) and the derived cell line deficient for caspase-8 (clone I9-2) were kindly provided by

Dr. J. Blenis (Boston, MA) [23]. I9-2a, b, d and e cells were isolated by limiting dilution experiments from I9-2 cells as previously described [13]. Cells were cultured in RPMI 1640 medium containing Glutamax and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS). HeLa cells were from ATCC and cultured in DMEM medium containing Glutamax and 10% FCS.

Flow cytometry analyses

For studying phosphatidylserine externalization, cells were labelled with annexin V-FITC (250 ng/mL) and propidium iodide (12.5 μ g/mL) (Immunotech, Marseille, France) for 10 min at 4°C. Alternatively, cell death of EGFP fluorescent cells was monitored after labelling with annexin V-APC (250 ng/mL) (Immunotech, Marseille, France) for 10 min at 4°C.

CD95 cell surface expression was determined after incubation of cells for 30 min at 4°C with or without anti-CD95-PE or an irrelevant antibody coupled to PE.

Analyses were performed on a FACScan (Becton Dickinson, Le-Pont-de-Claix, France) cytometer.

MTT assay

Viability was evaluated by the tetrazolium-based MTT assay. Cells were seeded in flat-bottom 96-well plates (10⁶ cells/mL, 100 μ L/well) for 8 hours at 37°C. After 2-hour incubation with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma), formazan crystals were solubilized overnight at 37°C by adding 100 μ L of solubilization buffer (HCl 0.01 N, 10% SDS) and spectrophotometrically quantified (λ = 590 nm).

Protein extraction, Western blotting analyses and fluorogenic DEVD and IETD cleavage enzyme assays

For total protein extraction, 5 to 20 \times 10⁶ cells were lysed for 30 min on ice in a buffer containing 10 mM HEPES (pH 7.4), 42 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5% CHAPS, 1 mM PMSF and 2 μ g/mL leupeptin. Samples were centrifuged at 10,000 g at 4°C for 10 min. Supernatants were collected and protein content was determined by the Bradford method (Biorad). For Western blot analyses, equal amounts of protein were separated on 15% SDS-PAGE. Caspase activities were assessed using Ac-DEVD-AMC or Ac-IETD-AMC substrates (Bachem) as described elsewhere [34].

Morphological analyses

100,000 Jurkat cells were sedimented onto microscope slides by cyto-spin at 100 g for 10 min. Cells were fixed by 0.4% paraformaldehyde, DAPI stained and examined under a fluorescence Leica microscope. Alternatively, HeLa cells were labelled with 2.5 μ M Syto 13 (Molecular probes, Leiden, The Netherlands) and 2 μ g/mL propidium iodide (Sigma). The percentage of apoptotic cells (having nuclear condensation and/or fragmentation) was evaluated by counting at least 500 cells for each condition under a Leica fluorescence-equipped inverted microscope as previously described [13].

Transfection experiments

Jurkat cells were transiently transfected as previously described [35]. Briefly, 2 \times 10⁶ cells were incubated in 0.2 mL 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 250 mM sucrose and 1 mM MgCl₂. Eight μ g of plasmids encoding EGFP, EGFP-tagged wild-type caspase-8, EGFP-tagged C360S caspase-8 or EGFP-tagged wild-type caspase-10 were added before electro-pulsation. Alternatively, cells were co-transfected by 2 μ g of the plasmid encoding EGFP and 8 μ g of the plasmid encoding C401S caspase-10.

Electro-pulsation was carried out by 3 consecutive 10 ms rectangular pulses (240 V, electrode width 4 mm, 1 s delay). Immediately after pulse delivery, FCS was added to reach a 20% final concentration and cells were then incubated at 37°C in 2 mL RPMI medium containing 10% FCS. Under these optimized experimental conditions, 14±3% (mean ± SEM, n=7) of the Jurkat cells transfected with the plasmid encoding EGFP robustly expressed EGFP (mean fluorescence intensity = 1588±150, mean ± SEM).

HeLa cells were transiently transfected with 8 µg of plasmids encoding EGFP, EGFP-tagged wild-type caspase-8 or EGFP-tagged wild-type caspase-10 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to manufacturers' recommendations.

HeLa cells transfected with EGFP-tagged caspase-10 were cultured in the presence of 0.8 mg/mL G418 for 45 days. Stably EGFP-tagged caspase-10 expressing cells (Casp10+ cells) and their control counterparts (Casp10- cells) were sorted using a FAC-SARIA-SORP cell sorter and routinely maintained under 0.8 mg/mL G418.

References

- Rao VK, Straus SE (2006) Causes and consequences of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Hematology* 11: 15–23.
- Rieux-Laucat F (2006) Inherited and acquired death receptor defects in human Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. *Curr Dir Autoimmun* 9: 18–36.
- Lenardo MJ (2003) Molecular regulation of T lymphocyte homeostasis in the healthy and diseased immune system. *Immunol Res* 27: 387–398.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505–512.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, et al. (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.
- Vincenz C, Dixit VM (1997) Fas-associated death domain protein interleukin-1beta-converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling. *J Biol Chem* 272: 6578–6583.
- Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, et al. (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.
- Muzio M, Salvesen GS, Dixit VM (1997) FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem* 272: 2952–2956.
- Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, et al. (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 276: 46639–46646.
- Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326(Pt 1): 1–16.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491–501.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (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.
- Milhas D, Cuvillier O, Therville N, Clave P, Thomsen M, et al. (2005) Caspase-10 triggers bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280: 19836–19842.
- Fischer U, Stroh C, Schulze-Osthoff K (2006) Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene* 25: 152–159.
- Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, et al. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1: 489–495.
- Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandenberghe P (2001) Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* 58: 356–370.
- Maefait J, Beyaert R (2008) Non-apoptotic functions of caspase-8. *Biochem Pharmacol* 76: 1365–1373.
- Siegel RM, Martin DA, Zheng L, Ng SY, Bertin J, et al. (1998) Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J Cell Biol* 141: 1243–1253.
- Shikama Y, Yamada M, Miyashita T (2003) Caspase-8 and caspase-10 activate NF-kappaB through RIP, NIK and IKKalpha kinases. *Eur J Immunol* 33: 1998–2006.
- Wang H, Wang P, Sun X, Luo Y, Wang X, et al. (2007) Cloning and characterization of a novel caspase-10 isoform that activates NF-kappaB activity. *Biochim Biophys Acta* 1770: 1528–1537.
- Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ (2001) Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13884–13888.
- Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, et al. (2002) Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *Embo J* 21: 4520–4530.
- Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* 8: 1001–1008.
- Kadohara K, Nagumo M, Asami S, Tsukumo Y, Sugimoto H, et al. (2009) Caspase-8 mediates mitochondrial release of pro-apoptotic proteins in a manner independent of its proteolytic activity in apoptosis induced by the protein synthesis inhibitor acetoxycycloheximide in human leukemia Jurkat cells. *J Biol Chem* 284: 5478–5487.
- Barcia RN, Valle NS, McLeod JD (2003) Caspase involvement in RIP-associated CD95-induced T cell apoptosis. *Cell Immunol* 226: 78–85.
- Matsumura H, Shimizu Y, Ohsawa Y, Kawahara A, Uchiyama Y, et al. (2000) Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *J Cell Biol* 151: 1247–1256.
- Kawahara A, Ohsawa Y, Matsumura H, Uchiyama Y, Nagata S (1998) Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. *J Cell Biol* 143: 1353–1360.
- Boone E, Vanden Berghe T, Van Loo G, De Wilde G, De Wael N, et al. (2000) Structure/Function analysis of p55 tumor necrosis factor receptor and fas-associated death domain. Effect on necrosis in L929A cells. *J Biol Chem* 275: 37596–37603.
- Morgan MJ, Thorburn J, Thomas L, Maxwell T, Brothman AR, et al. (2001) An apoptosis signaling pathway induced by the death domain of FADD selectively kills normal but not cancerous prostate epithelial cells. *Cell Death Differ* 8: 696–705.
- Thorburn J, Bender LM, Morgan MJ, Thorburn A (2003) Caspase- and serine protease-dependent apoptosis by the death domain of FADD in normal epithelial cells. *Mol Biol Cell* 14: 67–77.
- Worth A, Thrasher AJ, Gaspar HB (2006) Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Br J Haematol* 133: 124–140.
- Zhu S, Hsu AP, Vacek MM, Zheng L, Schaffer AA, et al. (2006) Genetic alterations in caspase-10 may be causative or protective in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Hum Genet* 119: 284–294.
- Shimizu M, Fontana A, Takeda Y, Yagita H, Yoshimoto T, et al. (1999) Induction of antitumor immunity with Fas/APO-1 ligand (CD95L)-transfected neuroblastoma neuro-2a cells. *J Immunol* 162: 7350–7357.
- Cuvillier O, Edsall L, Spiegel S (2000) Involvement of sphingosine in mitochondria-dependent Fas-induced apoptosis of type II Jurkat T cells. *J Biol Chem* 275: 15691–15700.
- Gabriel B, Sureau F, Casselyn M, Teissie J, Petit PX (2003) Retroactive pathway involving mitochondria in electroloaded cytochrome c-induced apoptosis. Protective properties of Bcl-2 and Bcl-XL. *Exp Cell Res* 289: 195–210.

Statistical analysis

Results are expressed as means ± SEM of at least three independent experiments. Mean values were compared using the Student's t-test. Differences were considered statistically significant when p<0.05 (as indicated by an asterisk on the figures; n.s., not significant).

Acknowledgments

We thank Dr. M. Lenardo (Bethesda, MD) for providing plasmids encoding caspases, and Dr. J. Blenis (Boston, MA) for providing the I9-2 Jurkat cells. The excellent technical assistance of P. Clavé, S. Carpentier, V. Garcia, J.C. Thiers, J. Olivier, F. L'Faqih and J.C. Lepert is gratefully acknowledged. We thank Drs. S.C. Sorli (U858 INSERM, Toulouse, France) and P. Legembre (Université RENNES-1, France) for critical reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EL DM BS. Performed the experiments: EL DM JT NT BS. Analyzed the data: EL DM JT NAA TL HB BS. Contributed reagents/materials/analysis tools: JT. Wrote the paper: EL NAA TL HB BS.

I.2. Conclusion de l'article 1 :

Dans cette étude, nous avons utilisé dans un premier temps les cellules Jurkat I9-2e, doublement déficientes en caspases 8 et 10, très largement résistantes à l'apoptose induite par CD95L. Nous avons d'abord confirmé les données déjà publiées dans l'équipe qui mettent en évidence que l'induction d'apoptose par CD95L est corrélée au niveau d'expression de la caspase 10 par les différents clones d'I9-2. Les cellules I9-2e ont ensuite été transfectées de façon transitoire avec des plasmides codant pour les caspases 8 ou 10, catalytiquement actives, ou non, et incubées en présence, ou non, de CD95L et de zVAD-fmk. De façon intéressante, la réexpression de la caspase 8 seule, ou de la caspase 10 seule, permet de sensibiliser ces cellules à la mort induite par CD95L. A l'inverse, l'expression des caspases catalytiquement inactives ne permet pas de restaurer une sensibilité vis-à-vis de CD95L. Ces données confirment donc l'importance de la caspase 8 dans l'apoptose dépendante de CD95 et suggèrent à nouveau que la caspase 10, dans ce modèle, pourrait se substituer à la caspase 8 pour l'induction d'apoptose. De plus, cet effet sensibilisateur dépendrait de leur activité catalytique. Elles permettent également de confirmer que la résistance des cellules I9-2e n'est pas liée à un « effet clone », mais bel et bien à la double déficience en caspases 8 et 10. De façon intéressante, la seule surexpression de la caspase 8 ou 10 inactive, portant respectivement les mutations des cystéines catalytiques C360S et C401S, induit une légère augmentation de la mort cellulaire, ce qui suggère que ces protéases pourraient aussi avoir un effet cytotoxique indépendant de leur activité catalytique, même si cet effet semble relativement mineur dans ce contexte. Un autre groupe a déjà utilisé le même type de stratégie sur les cellules I9-2, la population parentale de cellules déficientes en caspase 8 dont est issu le clone I9-2e. Ainsi, le groupe d'Henning Walczak a généré plusieurs clones de cellules à partir des I9-2 réexprimant de façon stable, et à un niveau au moins comparable à des cellules Jurkat parentales A3, la caspase 10 (Sprick *et al.*, 2002). Les auteurs indiquent qu'aucun des clones ne présente de sensibilisation vis-à-vis de l'apoptose induite par TRAIL. Certains de ces clones présentaient toutefois une sensibilité augmentée par rapport aux cellules I9-2 mais seulement aux plus fortes doses de CD95L testées, à partir de 100 ng/mL. Cet effet sensibilisateur aux fortes doses n'était pas nécessairement corrélé au niveau d'expression de la caspase 10. Il est alors envisageable que la caspase 10, qui est recrutée au niveau du DISC, puisse se substituer à la caspase 8 dans la signalisation de CD95 uniquement dans le cas d'un signal suffisamment fort ou prolongé, comme suggéré par d'autres auteurs (Kischkel, 2001). Il est également possible que certains des clones isolés dans l'étude de Sprick et de ses

collaborateurs présentent des modifications d'expression ou d'activité de molécules anti-apoptotiques, comme Bcl-2, ou des inhibiteurs de caspases, ou pro-apoptotiques tels que Bax, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet de la réexpression de la caspase 10. Il est à noter qu'une différence d'expression de CD95 peut d'ores et déjà être écartée, les auteurs ayant vérifié l'absence de variation d'expression de CD95 dans les différents clones (Sprick *et al.*, 2002).

Nous avons ensuite cherché à évaluer l'impact de l'expression des caspases 8 ou 10 dans la mort cellulaire ayant lieu en présence de CD95L et de zVAD-fmk. Dans les cellules A3, la mort cellulaire induite par CD95L en présence de zVAD-fmk est caractérisée par une double positivité à l'Annexine-V et à l'iodure de propidium. De plus, les cellules présentent une condensation chromatinienne partielle sans diminution de la taille nucléaire, ce qui laisse penser à une mort ayant à la fois des caractéristiques de nécrose et d'apoptose. De façon intéressante, les cellules I9-2e sont complètement résistantes à ce type de mort cellulaire alors que le clone I9-2d, qui exprime naturellement la caspase 10, présente un pourcentage comparable de cellules Annexine V positives (et majoritairement IP positives), à celui des cellules parentales, ce qui suggère que l'expression de la caspase 10 est nécessaire à l'induction de ce type de mort. De plus, seule la réexpression transitoire de la caspase 10, mais pas de la caspase 8, dans les cellules I9-2e permettait de restaurer de façon significative la mort cellulaire en présence de CD95L et de zVAD-fmk, suggérant un rôle de la caspase 10 dans la mort dépendante de CD95 en présence de cet inhibiteur.

Afin de tester ces hypothèses dans un système cellulaire plus facilement transfectable et relativement sensible à la mort induite par CD95L, nous avons utilisé des cellules HeLa qui expriment naturellement la caspase 8 mais pas la caspase 10. La transfection transitoire de ces cellules pour induire la surexpression de la caspase 8 ou 10 induit une mort cellulaire dans les deux cas. En présence de zVAD-fmk, la toxicité induite par la surexpression de la caspase 8 est inhibée tandis qu'environ 15% des cellules transfectées surexprimant la caspase 10 sont Annexine V positives. En western blot, cet inhibiteur ne permet pas de bloquer totalement l'activation de la caspase 10 surexprimée, ni le clivage de PARP en présence de CD95L. Nous avons ensuite généré des cellules HeLa transfectées de façon stable pour surexprimer la caspase 10 et nous avons isolé deux populations surexprimant ou non la caspase 10 parmi les cellules résistantes à l'agent de sélection. Les cellules Casp 10 +, qui expriment un niveau faible de caspase 10 en comparaison à des cellules Jurkat A3, sont sensibles à la mort

cellulaire induite par l'association CD95L et zVAD-fmk, contrairement à des cellules contrôles. De plus, le clivage de la caspase 10, en réponse à CD95L, n'est pas inhibé par le zVAD-fmk. Ceci renforce donc l'hypothèse selon laquelle la caspase 10 participe à la mort cellulaire induite par CD95L en présence de zVAD-fmk. Ce type de mort est donc classiquement considéré à tort comme indépendant des caspases et le mécanisme d'intervention de la caspase 10 dans l'induction de cette mort reste à clarifier.

Ainsi, les résultats de cet article suggèrent que la caspase 10 pourrait participer à la fois à l'apoptose induite par CD95L et à la mort induite par CD95L ayant lieu en présence de zVAD-fmk. Ils remettent également en cause l'existence de la voie de mort caspase-indépendante induite par ce ligand.

II. Article 2 : L'inhibition caspase-dépendante de la synthèse de sphingomyéline est fonctionnellement impliquée dans la mort induite par CD95L.

II.1. Contexte de l'article 2 :

Les SMS catalysent la synthèse de SM et de DAG à partir de céramide et de phosphatidylcholine. Le céramide et le DAG sont deux lipides bioactifs qui jouent des rôles opposés vis-à-vis de la survie cellulaire et la SM est un composant important des rafts, domaines membranaires dont la composition et l'intégrité influence la signalisation de plusieurs récepteurs, dont les DR. L'activité de synthèse de SM, *via* la régulation des taux de ces différents lipides, influence la prolifération et la survie cellulaire en réponse à de multiples stress (cf. chapitre II.4.4 de la revue générale). Plusieurs études suggèrent qu'elle pourrait être régulée, mais également jouer un rôle fonctionnel, dans la signalisation émanant des DR, dont CD95. Une première étude publiée en 2004, avant l'identification des gènes codant pour les SMS1 et 2, a mis en évidence que des cellules Jurkat stimulées avec un anticorps anti-CD95 agoniste présentent une élévation de céramide au niveau nucléaire et microsomal, attribuée dans cette étude à l'activation d'une SMase neutre à ces deux localisations et d'une inhibition de l'activité de synthèse de SM au niveau nucléaire. Par ailleurs, l'utilisation d'un inhibiteur de la caspase 3 permet d'empêcher l'élévation de céramide et d'inhiber l'apoptose dépendante de CD95 (Watanabe *et al.*, 2004). Les auteurs ont ainsi émis l'hypothèse que l'inhibition de la synthèse de SM participait à l'accumulation de céramide qui jouerait potentiellement un rôle fonctionnel, bien que tardif, dans l'induction de l'apoptose dépendante de CD95. En ce sens, la synthèse de SM jouerait plutôt un rôle anti-apoptotique.

A l'inverse, une étude publiée en 2005 indique que l'expression de la SMS1 dans des cellules lymphoïdes murines WR19L, totalement déficientes en SM, permet de les sensibiliser à l'apoptose dépendante de CD95 *via* une augmentation de la localisation et du clustering de CD95 dans les rafts, ainsi qu'une augmentation de la formation du DISC et de l'activation des caspases. Ces cellules exprimant SMS1 présentent également une importante élévation de céramide suite à la stimulation de CD95, ce qui n'est pas du tout observé dans des cellules totalement déficientes en SM. Ainsi, dans ces cellules, la SM membranaire semble primordiale pour l'induction de mort en tant que lipide précurseur pour la génération de céramide, et elle favorise les événements membranaires et la formation du DISC (Miyaji *et al.*, 2005). Ces auteurs associent donc un rôle pro-apoptotique à la synthèse de SM.

Afin de clarifier le rôle de la synthèse de SM dans la mort induite par CD95L, nous avons cherché : (i) à évaluer si, et comment, la synthèse de SM est inhibée en réponse à CD95L dans deux types de lignées cellulaires cancéreuses humaines, des cellules leucémiques T Jurkat et des cellules HeLa de carcinome du col de l'utérus ; (ii) à déterminer si cette activité influence la signalisation apoptotique émanant de CD95. Nous avons modulé l'expression des SMS par interférence à l'ARN ou par transfection du cDNA codant pour ces enzymes, puis nous avons évalué les conséquences sur la signalisation caspase-dépendante en réponse à CD95L.

Caspase-mediated inhibition of sphingomyelin synthesis is involved in FasL-triggered cell death

E Lafont^{1,2,7}, D Milhas^{1,2,7}, S Carpentier^{1,2}, V Garcia^{1,2}, Z-X Jin³, H Umehara³, T Okazaki⁴, K Schulze-Osthoff⁵, T Levade^{1,2}, H Benoist^{1,2,6} and B Ségui^{*,1,2,6}

Ceramide can be converted into sphingomyelin by sphingomyelin synthases (SMS) 1 and 2. In this study, we show that in human leukemia Jurkat cells, which express mainly SMS1, Fas ligand (FasL) treatment inhibited SMS activity in a dose- and time-dependent manner before nuclear fragmentation. The SMS inhibition elicited by FasL (1) was abrogated by benzyloxycarbonyl valyl-alanyl-aspartyl-(*O*-methyl)-fluoromethylketone (zVAD-fmk), a broad-spectrum caspase inhibitor; (2) did not occur in caspase-8-deficient cells and (3) was not affected in caspase-9-deficient cells. Western blot experiments showed SMS1 cleavage in a caspase-dependent manner upon FasL treatment. In a cell-free system, caspase-2, -7, -8 and -9, but not caspase-3 and -10, cleaved SMS1. In HeLa cells, SMS1 was Golgi localized and relocated throughout the cytoplasm in cells exhibiting an early apoptotic phenotype on FasL treatment. zVAD-fmk prevented FasL-induced SMS1 relocation. Thus, FasL-mediated SMS1 inhibition and relocation depend on caspase activation and likely represent proximal events in Fas signaling. FasL-induced ceramide production and cell death were enhanced in cells stably expressing an siRNA against SMS1. Conversely, in cells stably overexpressing SMS1, FasL neither increased ceramide generation nor efficiently induced cell death. Altogether, our data show that SMS1 is a novel caspase target that is functionally involved in the regulation of FasL-induced apoptosis.

Cell Death and Differentiation (2010) 17, 642–654; doi:10.1038/cdd.2009.130; published online 25 September 2009

Fas (CD95) engagement by Fas ligand (FasL; CD95L, CD178) has a crucial function in the regulation of T-cell homeostasis, essentially through cell death induction in activated T cells. FasL-induced T-cell death is viewed as an essential negative regulatory mechanism of T-cell activation, limiting T-cell reactivity in immune responses and autoimmune diseases. In humans, gene mutations affecting either FasL, Fas or Fas signaling proteins such as initiator caspases are responsible for autoimmune lymphoproliferative syndrome.¹

Scaffidi *et al.*² reported the existence of two different cell types as defined by distinct Fas signaling routes. Type 1 cells were originally defined by their capacity to form large amounts of the death-inducing signaling complex (DISC), consisting in the recruitment of the adapter protein FADD and initiator caspase-8 and -10 to the Fas receptor on activation.^{3–5} This enables a strong and direct activation of the caspase cascade independently of mitochondrial events. In contrast, type 2 cells, such as Jurkat T leukemia cells, form a DISC less efficiently than do type 1 cells, and require an amplifying signal

from mitochondria for apoptosis induction. During this process, the DISC-activated initiator caspase-8 and -10 cleave the Bcl-2 family member Bid, which induces cytochrome *c* release and subsequent triggering of the mitochondrial caspase cascade.^{6–9} It has been recently reported that internalization of the Fas receptor is required for efficient DISC formation and apoptosis induction in type 1 but not type 2 cells.¹⁰

A growing body of evidence supports the involvement of ceramide, a sphingolipid bioactive molecule, or its metabolites, in stress-induced apoptosis (for a recent review, see Ségui *et al.*¹¹). This ceramide-induced cell death is inhibited by the overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL, suggesting the involvement of mitochondrial events.¹¹ Ceramide can be generated by the breakdown of the membrane phospholipid sphingomyelin (SM) as a consequence of sphingomyelinase (SMase) activation and/or increased *de novo* synthesis. Ceramide is synthesized within the endoplasmic reticulum and is converted in the Golgi to SM and glucosylceramide (GlcCer) by sphingomyelin synthase (SMS) and GlcCer

¹Cancer Department, U858 INSERM, Equipe 14, BP84225, 31432 Toulouse cedex 4, France; ²Cancer Department, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, IFR31, Bâtiment L3, Avenue Jean Poulhes, BP84225, 31432 Toulouse cedex 4, France; ³Division of Hematology and Immunology, Department of Internal Medicine, Kanazawa Medical University, Ishikawa 920-0293, Japan; ⁴Department of Clinical Laboratory, Medicine/Hematology, Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago, Tottori 683-8504, Japan; ⁵Interfaculty Institute for Biochemistry, University of Tübingen, Hoppe-Seyler-Str. 4, Tübingen 72076, Germany; ⁶Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Service d'Immunologie, Université Paul Sabatier (Toulouse III), 35 chemin des maraîchers, 31062 Toulouse cedex 4, France

*Corresponding author: B Ségui, U858 INSERM, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, BP 84225 31432, Equipe 14, Toulouse Cédex 4, France.

Tel: +33 5613 23534; Fax: +33 5613 22084; E-mail: bruno.segui@inserm.fr

⁷These authors contributed equally to this work.

Keywords: CD95; sphingomyelin synthase 1; ceramide; apoptosis; cancer cells

Abbreviations: ALPS, autoimmune lymphoproliferative syndrome; Bcl-2/xL, B-cell lymphoma-2/xL; DAG, diacylglycerol; DISC, death-inducing signaling complex; FasL, Fas ligand; GlcCer, glucosylceramide; GCS, glucosylceramide synthase; SM, sphingomyelin; SMS, sphingomyelin synthase; TLC, thin layer chromatography; zVAD-fmk, benzyloxycarbonyl valyl-alanyl-aspartyl-(*O*-methyl)-fluoromethylketone

Received 19.1.09; revised 22.7.09; accepted 10.8.09; Edited by JP Medema; published online 25.9.09

synthase (GCS), respectively. Both enzymes are capable of negatively regulating intracellular ceramide concentrations and are inhibited upon various stress conditions, which trigger ceramide elevation and cell death.¹¹ Tepper *et al.*¹² previously reported that GCS does not regulate ceramide generated on Fas cross-linking. A more recent study indicates that Fas engagement is accompanied by the inhibition of an SMS activity and ceramide increase within the nucleus.¹³ Different stimuli, including TNF α , photodynamic therapy and UVB, have been shown to inhibit *de novo* SM synthesis.^{14–17} Although homotrimerization of CERT (ceramide transfer protein) has been implicated in UVB-mediated inhibition of SM synthesis, the underlying mechanisms involved are largely unknown.¹⁷

Two different mammalian genes encoding SMS have been cloned so far.^{18,19} The corresponding proteins, SMS1 and SMS2, are both localized at the Golgi, SMS2 being localized at the plasma membrane as well.¹⁸ Both SMS1 and 2 transfer the phosphocholine moiety from phosphatidylcholine (PC) to ceramide to generate SM and diacylglycerol (DAG). As SMS1 and 2 initiate in opposite directions the formation of two important biologically active lipids, that is, ceramide and DAG, having opposite effects on cell death, SMS has been proposed as a putative regulator of cell survival and cell growth. As a matter of fact, ceramide decrease and DAG increase have been associated with a higher SMS activity in SV40-transformed fibroblasts than in normal counterparts.²⁰ In HeLa cells, SMS1 or SMS2 silencing resulted in intracellular ceramide accumulation and cell-cycle arrest.²¹ In addition, different reports indicate antiapoptotic functions for SMS. In patients, a decreased intracellular ceramide level was associated with a higher SMS activity in chemoresistant leukemia.²² Recently, SMS1 has been identified by screening a mouse T-cell cDNA library in *Saccharomyces cerevisiae* as a suppressor of the growth-inhibitory effect of Bax and other cytotoxic stimuli, including hydrogen peroxide, heat shock, osmotic stress and exogenous ceramide.²³ The expression of SMS1 in yeast could limit ceramide accumulation and cell death signaling.²³ Moreover, SMS1 overexpression protected Jurkat cells from phototherapy-induced cell death,¹⁵ whereas SMS1 or SMS2 knockdown sensitized cells.¹⁶ SMS1 overexpression was also partially protective against apoptosis of oligodendrogloma cells triggered by staurosporine.²⁴ In addition, the expression of CERT, which is required for SM synthesis,²⁵ was increased in drug-resistant cell lines and in residual ovarian tumors after paclitaxel treatment.²⁶ Moreover, CERT knockdown significantly sensitized cancer cells to multiple anticancer drugs.²⁶

Nevertheless, three reports suggested a proapoptotic function of SMS. Murine lymphoma cells, completely deficient for SMS activity and lacking SM, were resistant toward alkyllysophosphatidylcholine.²⁷ Fas-mediated apoptosis was partly impaired in a murine leukemia cell line deficient in SMS, and overexpression of SMS1 restored full caspase activation and cell death.²⁸ Thus, a complete and sustained inhibition of SMS might alter membrane composition and properties through SM depletion and confer partial cell death resistance.¹¹ More recently, an overexpression of SMS1 or 2 in Chinese hamster ovarian cells enhanced TNF-induced apoptosis, whereas SMS1 or 2 knockdown in THP-1-derived

macrophages was partially protective against cell death mediated by LPS.²⁹ Protection from LPS-induced cell death has been further shown to be mediated by an impaired membrane recruitment of TLR4 signaling complexes in macrophages of SMS2 knockout mice.³⁰

This study aimed at investigating the function of SM biosynthesis in the regulation of FasL-induced cell death. We show that Fas-mediated apoptosis is associated with a profound inhibition of SM synthesis, which likely involved the caspase-mediated cleavage and relocation of SMS1. Furthermore, our finding that downregulation of SMS1 sensitized cells to apoptosis, whereas SMS1 overexpression had opposite effects, strongly underscores the importance of SM metabolism for the regulation of FasL-triggered cell death.

Results

FasL triggers caspase-dependent inhibition of *de novo* SM synthesis.

In Jurkat cells, SM represents the most abundant sphingolipid (approximately 70% of total sphingolipids), whereas ceramide content averages 8% of [³H]sphingosine-labeled lipids (Figure 1a). FasL treatment induced profound changes in the sphingolipid pattern (Figure 1a). Notably, ceramide content strongly increased in a time-dependent manner up to 20%, concomitantly to SM decrease and cell death induction (Figure 1b and c). In sharp contrast, no or little variation was observed for the cellular content of GlcCer and lactosylceramide (Figure 1b). SM decrease and ceramide increase were likely a consequence of SMase activation, as FasL has been reported to activate both neutral and acidic SMases.³¹ We hypothesized, however, that an inhibition of SM synthesis might also account for the observed changes in sphingolipid levels. Indeed, incubation with FasL elicited a sustained and substantial inhibition of SM synthesis, which was already detectable within 1 h and was almost complete after 4 h of treatment (Figure 1d). The inhibition of SM synthesis occurred concomitantly to apoptosis induction (Figure 1c) and ceramide generation (Figure 1e and f). It is noteworthy that *de novo* PC synthesis was also inhibited in FasL-treated Jurkat cells (Supplementary Figure 1).

We next measured *in situ* SMS and GCS activities by monitoring in intact cells the conversion of a fluorescent analog of ceramide into SM and GlcCer, respectively. Although GCS activity remained unaffected during the first 4 h, FasL triggered the inhibition of SMS (up to 90%) in a time- (Figure 2a) and dose- (Supplementary Figure 2B) dependent manner. Inhibition of *in situ* SMS activity might be a direct (cleavage and inactivation of SMS) or indirect (for instance, decrease of endogenous substrate production and/or accessibility) consequence of caspase activation. We next measured SMS-specific activity (i.e., under conditions allowing SMS measurement using an excess of exogenous substrates). SMS-specific activity was significantly decreased in protein extracts of FasL-treated Jurkat cells (Supplementary Figure 2C). The addition of benzyloxycarbonyl valyl-alanyl-aspartyl-(*O*-methyl)-fluoromethylketone (zVAD-fmk) to the culture medium abrogated this phenomenon (Supplementary Figure 2C), indicating that SMS enzymes may be directly

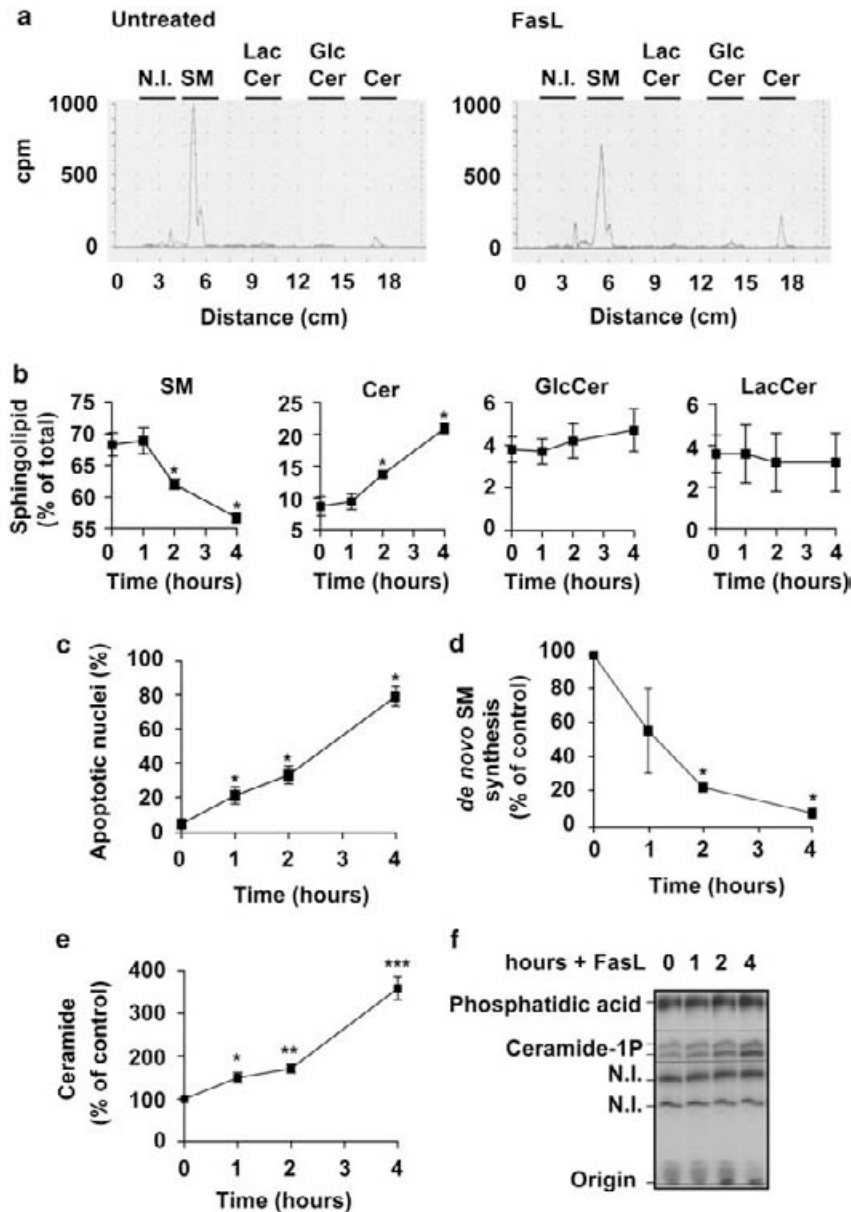


Figure 1 Treatment of Jurkat cells with FasL alters the sphingolipid content and inhibits SM synthesis. (a and b) Jurkat cells (clone A3) were incubated for 48 h in the presence of [3 H]sphingosine (0.33 μ Ci/ml). Cells (3×10^6) were further incubated for 4 h (a) or for indicated times (b) in the presence (FasL) or absence (untreated) of 500 ng/ml FasL. Lipids were extracted and separated by TLC. (a) The sphingolipid pattern was analyzed by a radiochromatoscanner and representative images of four independent experiments are shown: nonidentified (NI) sphingolipids (possibly GM3), sphingomyelin (SM), lactosylceramide (LacCer), glucosylceramide (GlcCer) and ceramide (Cer). (b) The radioactivity in each lipid was quantified and expressed as the percentage of total sphingolipids present in the organic phase including the nonidentified (NI) sphingolipids. It is noteworthy that no variation of these nonidentified sphingolipids was observed upon FasL incubation (means \pm S.E.M., $n = 4$; data not shown). (c and d) Cells (3×10^6) were incubated in the presence of [3 H]choline (1 μ Ci/ml) for 4 h to allow phosphatidylcholine labeling and were further incubated for indicated times in the presence or absence of 500 ng/ml FasL. The proportion of cells exhibiting apoptotic nuclei (i.e., condensed and/or fragmented nuclei) was evaluated by microscopic analysis (c). [3 H]choline-labeled SM was quantified after alkaline methanolysis and results are expressed as the percentage of [3 H]choline-labeled SM measured in cells incubated in the absence of FasL at each corresponding time (d). (e and f) Cells (3×10^6) were incubated for indicated times in the presence or absence of 500 ng/ml FasL, and ceramide content was evaluated by DAG kinase assay. (f) Representative TLC plate: NI, nonidentified; phosphatidic acid, which results from the phosphorylation of DAG by DAG kinase, remained stable over time, indicating no change in total intracellular DAG in Fas signaling. (c–e) Data are means \pm S.E.M. of three independent experiments carried out in duplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

cleaved and inactivated by caspases. Interestingly, specific SMS activity was time dependently decreased on FasL treatment. This decrease was already significant at 15 min, before nuclear condensation and/or fragmentation and ceramide increase as evaluated both by DAG kinase assay

(Figure 2b) and mass spectrometry (Figure 2c). Mass spectrometry analysis indicated that C16:0 ceramide was the major ceramide species in Jurkat cells and a 4 h FasL treatment triggered a significant increase in all detectable ceramide species (Figure 2c).

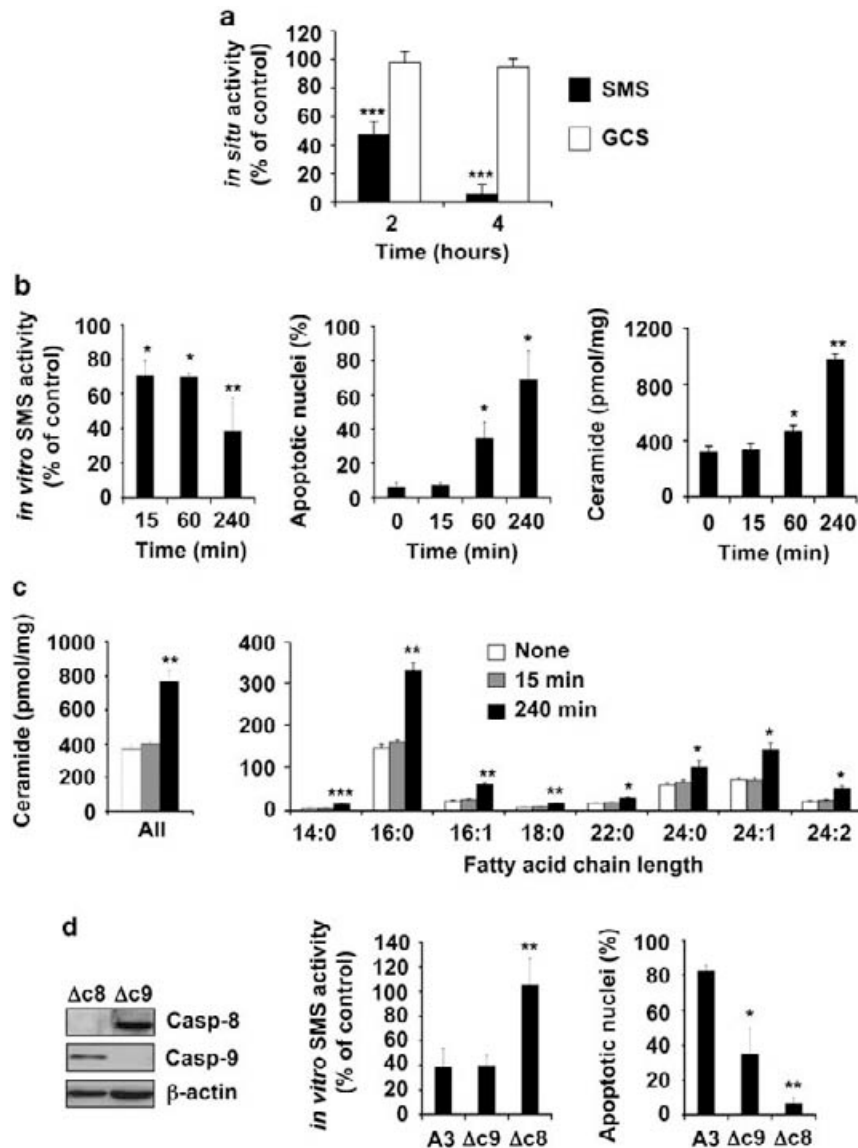


Figure 2 FasL triggers caspase-dependent inhibition of SMS activity. (a–c) Jurkat cells (clone A3) were incubated in the presence or absence of 500 ng/ml FasL for indicated times. (a) *In situ* SMS and GCS activities were measured by adding 2.5 μ M C₆-NBD-ceramide to the culture medium 2 h before stopping the reaction. (b) Specific SMS activity was measured on 200 μ g protein extracts (basal activity: 28 \pm 8 pmol/h/mg) and results are expressed as the percentage of untreated cells. The proportion of cells exhibiting apoptotic nuclei was evaluated by microscopic analysis. Ceramide was quantified by DAG kinase assay. (c) Ceramide was quantified by mass spectrometry. (d) Wild-type (clone A3), caspase-8-deficient (Δ c8, I9-2e variant) and caspase-9-deficient (Δ c9, JMR variant) Jurkat cells were incubated for 4 h in the presence or absence of 500 ng/ml FasL. Specific SMS activity and apoptosis were evaluated as above. (d) Left, western blot on protein extracts derived from Δ c8 and Δ c9 with anti-caspase-8, anti-caspase-9 and anti- β -actin. (a–d) Data are means \pm S.E.M. of three independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

To further explore the mechanism responsible for FasL-induced SMS inhibition, we evaluated the impact of the deficiency of either caspase-8 or -9 in Jurkat cells. FasL-induced apoptosis and inhibition of SMS activity were completely abolished in caspase-8-deficient (variant I9-2e) Jurkat cells (Figure 2d), in which caspase cascade activation was abrogated.⁸ Although caspase-9 deficiency significantly protected against FasL-induced cell death (Figure 2d),³² SMS inhibition still occurred in caspase-9-deficient (clone JMR) Jurkat cells (Figure 2d).

Altogether, our data indicate that FasL-mediated inhibition of SMS activity is not a mere consequence of cell death and

occurs through a caspase-dependent pathway, in between the activation of caspase-8 and -9.

SMS1 is Golgi localized and is a putative target for various caspases.

The expression of SMS1 and SMS2 was next evaluated by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) in Jurkat cells. Cycle threshold (C_t) values for SMS1 and SMS2 were 24.6 \pm 0.3 and 29.7 \pm 0.7 (mean \pm S.E.M., n = 3), respectively, suggesting that SMS1 is the predominant isoform in Jurkat cells, in agreement with a recent study.³³ Similar findings were reported in S49, a murine lymphoma cell line.²⁷ Considering the ability of FasL

to trigger a caspase-dependent inhibition of SMS activity in Jurkat cells, we hypothesized that SMS1 is a putative target of caspases.

To evaluate whether SMS1 is a direct caspase substrate, we used HeLa cells stably expressing human SMS1, which was tagged with the V5 epitope at the C terminus.¹⁸ In HeLa cells stably overexpressing V5-tagged SMS1, the overexpressed enzyme partially colocalized with the Golgi protein GM130, as revealed by the use of an anti-V5 antibody (Figure 3a). Very similar results were obtained using a polyclonal anti-SMS1 antibody directed against full-length human recombinant SMS1 (data not shown). It is noteworthy that this antibody also recognized the full-length human recombinant SMS1, as well as the overexpressed V5-tagged SMS1, by western blot (data not shown). Importantly, we also observed a partial colocalization of endogenous SMS1 with GM130, further indicating that SMS1 is indeed Golgi localized (Figure 3b). On FasL treatment, SMS1 was relocated throughout the cytoplasm in cells exhibiting nuclear conden-

sation. In early apoptotic cells, SMS1 and GM130 were still partially colocalized, strongly suggesting that the apparent SMS1 relocation was a consequence of Golgi fragmentation (Figure 3c). Moreover, SMS1 was hardly detectable in cells having fragmented nuclei (Figure 3c; Supplementary Figure 3). Similar findings were observed for GM130 (Figure 3c), which has been reported to be a putative caspase substrate in Fas signaling,³⁴ indicating that SMS1 is not the unique Golgi protein, the expression pattern of which is altered on FasL treatment. FasL did not change the SMS1 distribution pattern when cells were incubated in the presence of zVAD-fmk (Supplementary Figure 3). Thus, our data indicate that FasL triggered a caspase-dependent redistribution and disappearance of SMS1, suggesting that SMS1 is putatively degraded by caspases in Fas signaling.

To further evaluate this hypothesis, western blot analyses were performed to test whether SMS1 is cleaved by caspases. Western blot using an anti-SMS1 antibody was initially carried out on protein extracts derived from untreated

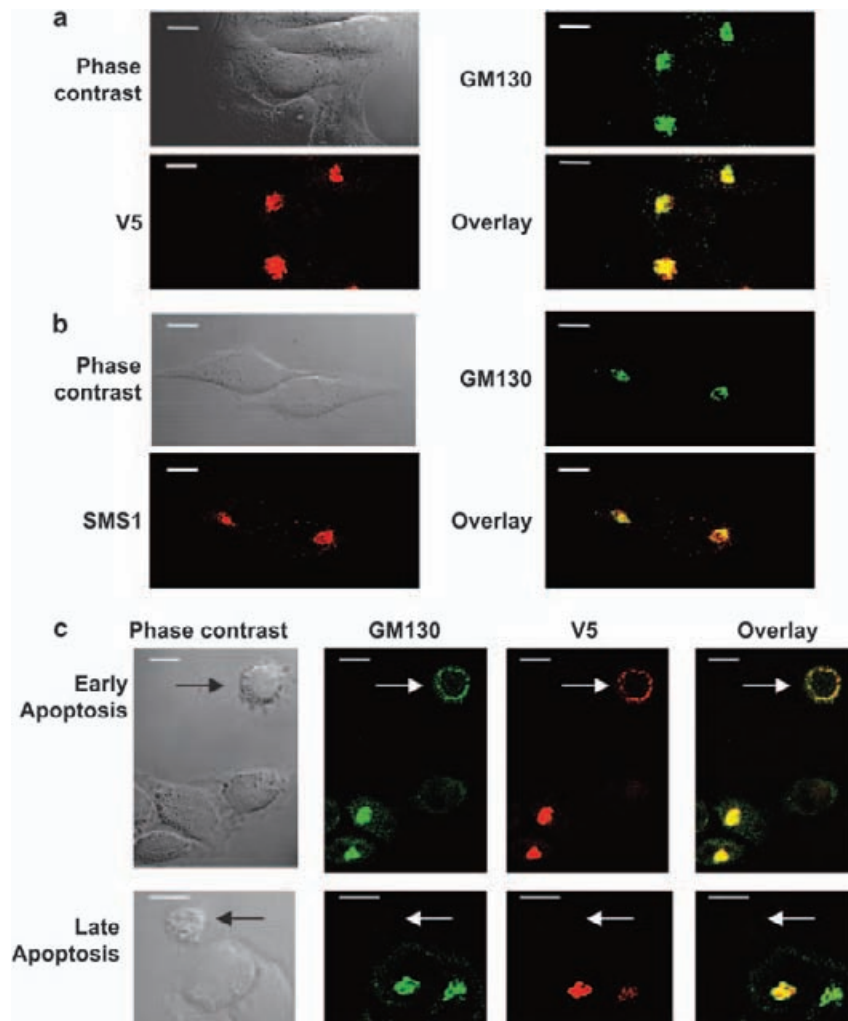


Figure 3 SMS1 is Golgi localized and relocated on FasL treatment. SMS1-V5-overexpressing (a and c) and mock-transfected (b) HeLa cells were labeled with anti-GM130, anti-V5 or anti-SMS1 antibodies, as indicated. (c) Cells were incubated in the presence or absence of 125 ng/ml FasL for 8 h and labeled with indicated antibodies. (a–c) Analyses were performed by confocal microscopy and data are representative of at least three independent experiments. Bars = 10 μm

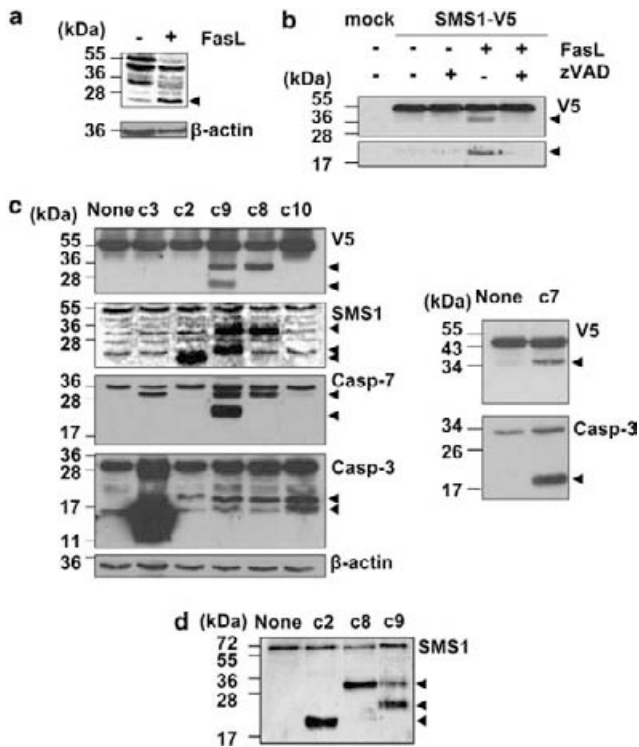


Figure 4 SMS1 is cleaved upon FasL treatment in a caspase-dependent manner. (a) Jurkat cells (clone A3) were incubated for 4 h in the presence or absence of FasL (500 ng/ml). Proteins (50 μ g) were analyzed by western blot using anti-SMS1 antibody. (b) Mock-transfected and SMS1-V5-overexpressing HeLa cells were incubated for 8 h in the presence or absence of FasL (500 ng/ml) and 40 μ M zVAD-fmk as indicated. Proteins (50 μ g) were analyzed by western blot using anti-V5 antibody. It is noteworthy that the lowest band was detected only after overexposure of the membrane. (c) Protein detergent extracts (200 μ g) prepared from SMS1-V5-overexpressing HeLa cells were incubated for 90 min in the presence or absence (none) of 3 U active recombinant caspase-2, -3, -7, -8, -9 and -10 (c2, c3, c7, c8, c9 and c10). Proteins (50 μ g) were analyzed by western blot using anti-V5, anti-SMS1, anti-casp-7, anti-casp-3 and anti- β -actin antibodies. (d) Recombinant SMS1 (100 ng) was incubated in the presence or absence (none) of 3 U active recombinant caspase-2, -8 and -9 (c2, c8 and c9) and was analyzed by western blot using anti-SMS1 antibody. (a–d) Arrowheads indicate the cleaved forms and data are representative of two independent experiments

and FasL-treated Jurkat cells. In lysates derived from untreated cells, two main bands of approximately 50 and 55 kDa were revealed. In protein extracts derived from FasL-treated cells, the SMS1 expression pattern was modified, with a loss of the upper band and an increase of a 20 kDa band, pointing to a cleavage of endogenous SMS1 in Fas signaling (Figure 4a). Incubation of HeLa cells stably expressing V5-tagged SMS1 with FasL triggered the appearance of two bands of about 36 and 20 kDa, as revealed by an anti-V5 antibody (Figure 4b). zVAD-fmk prevented the generation of these bands, indicating a caspase-dependent cleavage of SMS1 in Fas signaling (Figure 4b). To determine which caspase(s) might be involved in SMS1 cleavage, we carried out *in vitro* experiments by incubating protein extracts derived from HeLa cells overexpressing V5-tagged SMS1 in the presence of different active recombinant caspases. All tested caspases were active toward endogenous caspase-3 and/or -7 (Figure 4c). Various caspases including caspase-2, -7, -8

and -9, but not caspase-3 and -10, cleaved SMS1 as revealed by the anti-V5 antibody (Figure 4c). In addition, caspase-2, -8 and -9 cleaved recombinant human SMS1, further suggesting that SMS1 could be a direct substrate of those initiator caspases (Figure 4d).

Collectively, our data indicate that at least three initiator caspases, caspase-2, -8 and -9, and the effector caspase-7 may cleave and inactivate SMS1 in Fas signaling.

SMS1 knockdown enhances FasL-induced ceramide increase and apoptosis in Jurkat and HeLa cells.

To evaluate whether the inhibition of SMS1 may be a causal event in FasL-induced ceramide generation and apoptosis rather than a simple consequence of cell death, we initially knocked down SMS1 expression in Jurkat cells. Jurkat cell lines stably expressing siRNA against SMS1 have been recently characterized.³³ Expression of SMS1 mRNA in the SMS1 knockdown (KD) Jurkat variant (SMS1 KD) was reduced by approximately 40% as evaluated by quantitative real-time PCR³³ and analytical RT-PCR (Figure 5a), compared with Jurkat cells stably transfected with scrambled siRNA (control). It is noteworthy that SMS2 mRNA was not detected by RT-PCR in both control and SMS1 KD Jurkat cells (Figure 5a). SMS1 KD Jurkat cells showed approximately 40% reduction in SMS activity but retained normal GCS activity as compared with control Jurkat cells (Figure 5b; Jin *et al.*³³). Notably, the two variants showed a similar expression of Fas, FADD, caspase-8, -3 and -7, PARP and RIP, as evaluated by flow cytometry and western blotting (data not shown). Whereas SMS1 knockdown did not significantly impair the basal ceramide content (Figure 5c), the level of total SM was reduced by 15–20% in SMS1 KD as compared with that in control Jurkat cells (data not shown; Jin *et al.*³³). Upon FasL treatment, the increase in ceramide (Figure 5c and d) and the decrease in SM (Figure 5d) levels became further pronounced in SMS1 KD Jurkat cells.

SMS1 KD Jurkat cells and control cells were analyzed to further evaluate the importance of SMS inhibition in FasL-induced cell death. The knockdown of SMS1 clearly sensitized Jurkat cells to FasL-induced cell death (Figure 5e and f). In HeLa cells, transient SMS1 knockdown was accompanied by substantial SMS activity reduction (Figure 6a) and significantly sensitized cells to FasL-induced apoptosis (Figure 6b).

SMS1 overexpression impairs FasL-induced ceramide increase and apoptosis in HeLa cells.

We next evaluated the impact of SMS1 overexpression on FasL-induced ceramide production and cell death in HeLa cells. Compared with mock-transfected cells, HeLa cells overexpressing V5-tagged SMS1 showed a higher SMS activity and a lower GCS activity (Figure 6c). Moreover, SMS1 overexpression strongly impaired FasL-induced toxicity (Figure 6d) and ceramide increase (Figure 6e). It is noteworthy that HeLa cells overexpressing SMS1 were resistant toward all tested FasL concentrations (15–500 ng/ml) (Figure 6d). The resistance conferred by SMS1 overexpression was associated with a significant attenuation of FasL-induced apoptosis (Figure 6f). Finally,

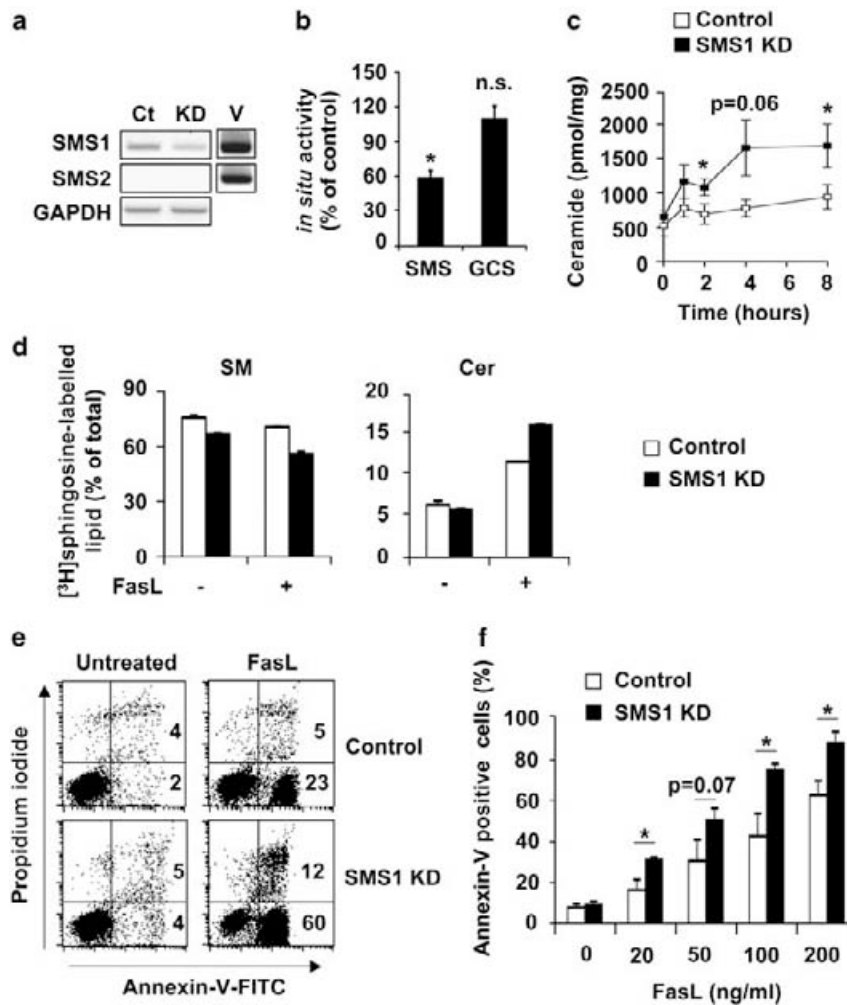


Figure 5 SMS1 silencing enhances FasL-induced ceramide production and apoptosis. (a) SMS1, SMS2 and GAPDH mRNA expression in SMS1 knockdown (KD) and control (Ct) Jurkat cells was analyzed by RT-PCR. Vectors (V) containing either SMS1 or SMS2 cDNA were used as positive controls for PCR. (b) SMS1 KD and control Jurkat cells were incubated in the presence of $2.5 \mu\text{M}$ $\text{C}_6\text{-NBD-ceramide}$ for 2 h. SMS and GCS activities were determined by quantifying fluorescent SM and GlcCer. SMS and GCS activities in SMS1 KD Jurkat cells are expressed as the percentage of those measured in control cells. Data are means \pm S.E.M. of three independent experiments. (c) Cells were incubated for indicated times in the presence or absence of 100 ng/ml FasL. Ceramide content was determined by DAG kinase assay (means \pm S.E.M., $n = 4$). (d) Cells were labeled with $0.33 \mu\text{Ci/ml}$ [^3H]sphingosine for 72 h. After a 2 h chase, cells were incubated in the presence or absence of 100 ng/ml FasL for 4 h. Lipids were extracted, separated by TLC, and the radioactivity associated with sphingomyelin (SM) and ceramide (Cer) was quantified. The radioactivity of each lipid is expressed as the percentage of total sphingolipids present in the organic phase. Values are means \pm S.E.M. of duplicate determinations. Similar data were obtained in two other experiments. (e and f) SMS1 KD and control Jurkat cells were incubated for 8 h with FasL (100 ng/ml), (e) or at indicated concentrations (f) and were analyzed by flow cytometry after Annexin V-FITC and propidium iodide labeling. Percentages of Annexin-V-positive and propidium-iodide-negative (low right quadrants) and propidium-iodide-positive cells (upper quadrants) are indicated (e). Values are means \pm S.E.M. of three independent experiments (f). * $P < 0.05$

transfection of SMS1 siRNA substantially decreased the overexpressed SMS1 and significantly sensitized cells to FasL (Figure 6g). The role of SMS2 in FasL-induced apoptosis has also been investigated in HeLa cells. Our findings indicate that, under certain experimental conditions, SMS2 may also negatively regulate FasL-induced apoptosis (Supplementary Figure 4).

Altogether, our results show that an increased SMS1 expression can confer resistance of cancer cells to FasL, whereas its decrease can sensitize cells.

SMS1 inhibits FasL-induced caspase activation. To delineate the molecular mechanisms involved in the

inhibition of FasL-induced cell death mediated by SMS1, we analyzed caspase activation in SMS1 KD (Figure 7a) and SMS1 overexpressing (Figure 7b) cells on FasL treatment. Although caspase-3 and PARP cleavage was enhanced in SMS1 KD Jurkat cells (Figure 7a), it was significantly reduced in SMS1 overexpressing HeLa cells (Figure 7b). Accordingly, the efficiency of caspase-3 processing (that is, the disappearance of the proform and appearance of the active p17 form) inversely correlated with SMS1 expression. In addition, whereas SMS1 knockdown increased caspase-8 processing (Figure 7a), the caspase-8 cleavage remained poorly affected by SMS1 overexpression (Figure 7b). Of particular interest was the fact that FasL-induced caspase-9

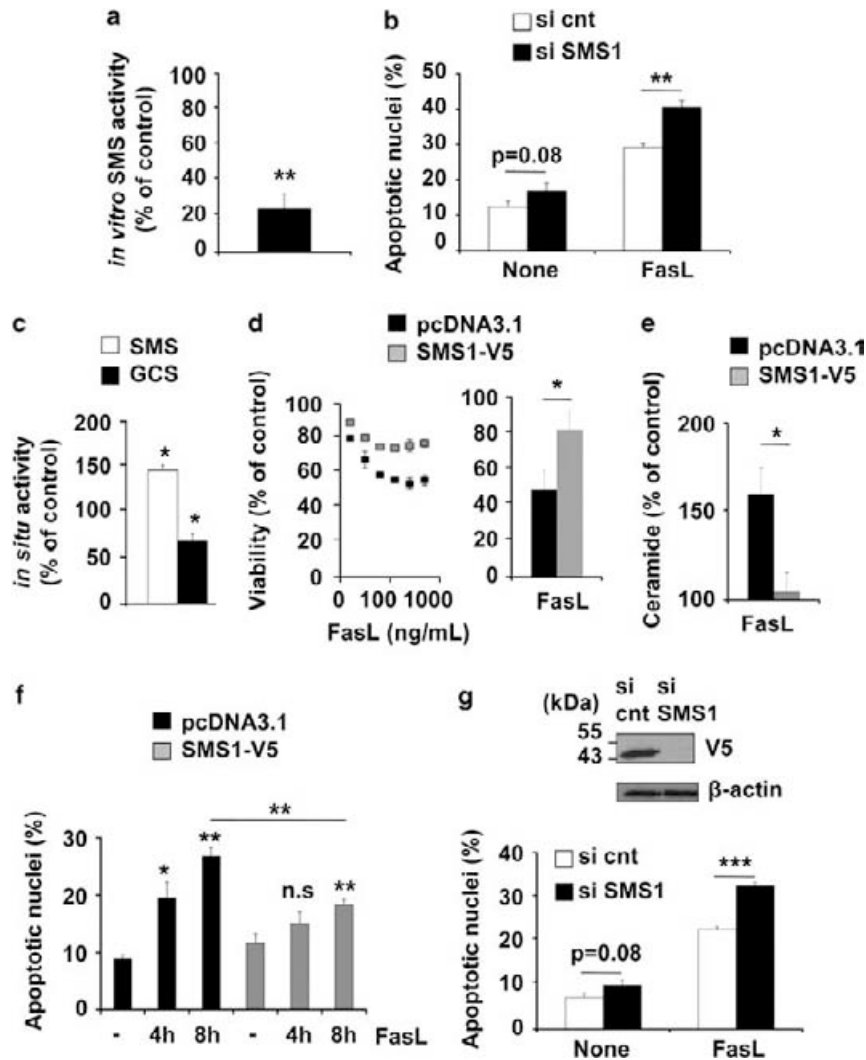


Figure 6 SMS1 levels in HeLa cells correlate with protection against FasL-induced cell death. (a and b) HeLa cells were transfected with control siRNA (si cnt) or siRNA to SMS1 (si SMS1) and were further incubated for 72 h. (a) Specific SMS activity was measured on 200 μ g protein extracts (basal activity: 328 ± 62 pmol/h/mg) and results obtained in cells transfected with siRNA to SMS1 are expressed as the percentage of cells transfected with control siRNA. (b) Cells were further incubated for 8 h in the presence or absence of FasL (125 ng/ml). The proportion of cells exhibiting apoptotic nuclei was evaluated by microscopic analysis. (a and b) Data are means \pm S.E.M., $n = 3$. (c) *In situ* SMS and GCS activities were measured in mock-transfected (pcDNA3.1) and SMS1-V5-overexpressing (SMS1-V5) HeLa cells. Data obtained in SMS1-overexpressing HeLa cells are expressed as the percentage of those measured in control cells (mean \pm S.E.M., $n = 3$). (d and e) Cells were incubated for 8 h in the presence or absence of FasL (125 ng/ml or the indicated concentrations). Cell viability (d) and ceramide level (e) were assessed by MTT assay and by the DAG kinase method, respectively. Results are expressed as the percentage of untreated cells for each cell line: (d) left, data are means \pm S.E.M. of three determinations from a representative experiment; (d) right and (e) data are means \pm S.E.M. of three independent experiments. (f) Proportion of apoptotic nuclei in mock-transfected (pcDNA3.1) and SMS1-V5-overexpressing (SMS1-V5) HeLa cells incubated for indicated times in the presence or absence of 125 ng/ml FasL (mean \pm S.E.M., $n = 3$). (g) SMS1-overexpressing HeLa cells were transfected with control siRNA (si cnt) or siRNA to SMS1 (si SMS1) and were further incubated for 72 h. Inset, western blot on 50 μ g protein extracts using anti-V5 or anti- β -actin antibodies. Cells were further incubated for 8 h in the presence or absence of FasL (125 ng/ml) and the proportion of cells exhibiting apoptotic nuclei was evaluated (means \pm S.E.M., $n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

cleavage was greatly enhanced in SMS1 KD Jurkat cells (occurring 2 h before and being complete by 8 h; Figure 7a) but was significantly prevented by SMS1 overexpression in HeLa cells (with no detectable cleavage at 4 h; Figure 7b). In addition, FasL-triggered cytochrome *c* release was significantly decreased in SMS1-overexpressing HeLa cells as compared with that in mock-transfected cells (data not shown).

Collectively, our data indicate that SMS1 modulates caspase cascade activation on FasL treatment, acting most likely at the mitochondrial level.

Discussion

This study supports the notion that FasL-induced inhibition of SMS alters the cellular sphingolipid pattern, including SM

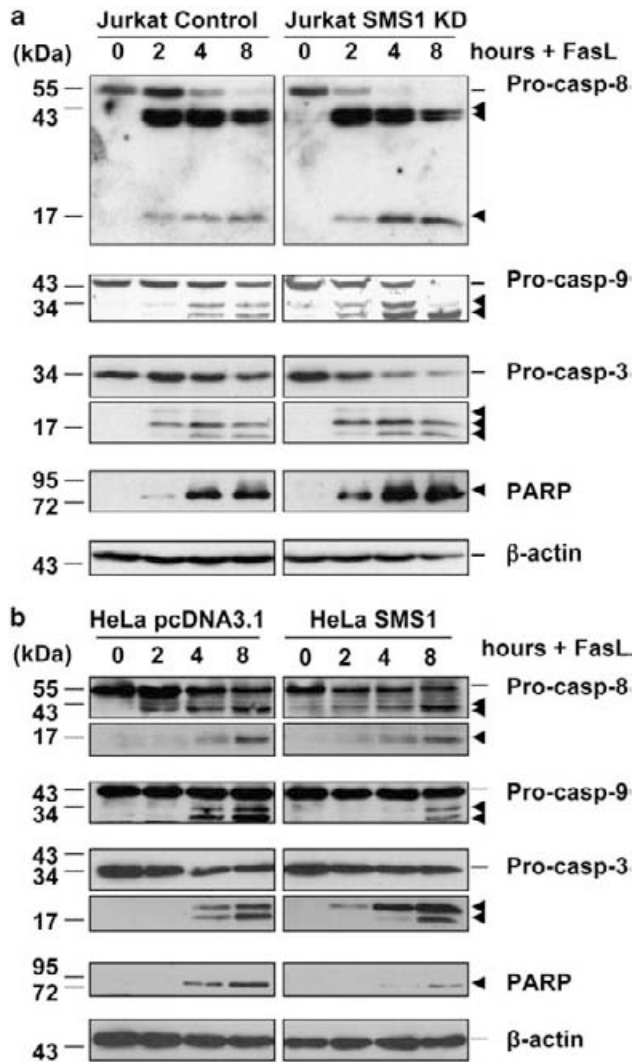


Figure 7 SMS1 inhibits FasL-triggered caspase cascade activation. Control and SMS1 KD Jurkat cells (a), and mock-transfected and SMS1-overexpressing HeLa cells (b) were incubated for the indicated times in the presence of 100 ng/ml FasL. Proteins were extracted and analyzed by western blotting using anti-caspase-8, anti-caspase-9, anti-caspase-3, anti-PARP and anti- β -actin antibodies. Arrowheads indicate cleaved forms. Results are representative of two independent experiments

decrease and ceramide increase, and contributes to cell death induction.

FasL-induced SMS inhibition occurred before apoptosis induction and ceramide generation through a caspase-dependent process and was strongly impaired in caspase-8-deficient cells but not in caspase-9-deficient cells. Thus, SMS inhibition appears as a proximal event in Fas signaling that primarily occurs in between the activation of caspase-8 and caspase-9. In addition, our data indicate that SMS1 is a putative target of at least the effector caspase-7 and three initiator caspases including caspase-2, -8 and -9. We also provide evidence for the first time that, similar to the overexpressed V5-tagged enzyme (see Figure 3a and Huitema *et al.*¹⁸), endogenous SMS1 colocalizes with a Golgi

marker (see Figure 3b), further arguing that SMS1 is indeed a Golgi protein. On FasL treatment, SMS1 relocalized throughout the cytoplasm in cells exhibiting nuclear condensation. Moreover, the loss of SMS1 expression in late apoptotic cells (that is, exhibiting nuclear fragmentation) is in favor of SMS1 proteolysis, in agreement with our western blot analyses indicating caspase-dependent SMS1 cleavage in Fas signaling (see Figure 4b).

The possibility that inhibition of SM synthesis may represent an important event in FasL-induced cell death signaling is highlighted by the enhanced sensitivity of SMS1 KD Jurkat cells to FasL. These data may seem at odds with a previous report showing FasL resistance of a mouse leukemia cell line (WR19L) deficient for SMS activity.²⁸ In this particular mouse cell line, the reduction of SM synthesis was accompanied by a strong SM depletion in membranes, notably within lipid rafts. Thus, the initiation of Fas signaling was greatly compromised, most likely as the consequence of altered biochemical and biophysical properties of the plasma membrane. SM breakdown through acidic SMase has indeed been reported as an essential event for ceramide generation at the cell surface, facilitating Fas capping.^{11,35} The reduced SM content in WR19L may be limiting for ceramide generation by SMase. As a matter of fact, early events in Fas signaling, such as receptor aggregation and capping, were impaired in SMS-deficient WR19L cells.²⁸ In this study, we used SMS1 KD Jurkat cells, which exhibited an approximately 40% inhibition of SMS activity and a 15% reduction of the total intracellular pool of SM. Thus, one can speculate that the remaining 85% SMs are sufficient for the proper relocation of Fas within the plasma membrane on FasL treatment.

In the S49 mouse lymphoma cell line, pharmacological (using U18666A) disturbance of cholesterol transport and lipid rafts was accompanied by an approximately 80% decrease in SM biosynthesis without affecting FasL-induced apoptosis.²⁷ One should note that, under these particular experimental conditions, no direct effect on SMS enzyme activity was observed,²⁷ in sharp contrast to our current study (see Figure 2b, d and Supplementary Figure 2C). In addition, we cannot rule out the possibility that the inhibition of SMS activity may enhance FasL-induced apoptosis in a cell-type-dependent manner. Our present study indicates that at least two human cancer cell lines (that is, Jurkat and HeLa cells) can be sensitized to FasL-induced apoptosis by silencing SMS1. Furthermore, the SMS2 knockdown in HeLa cells slightly enhanced FasL-induced apoptosis, although to a lesser extent as compared with SMS1 knockdown.

The high sensitivity of SMS1 KD Jurkat cells to FasL-induced apoptosis was associated with an exacerbated SM decrease and ceramide increase on Fas cross-linking. The inhibition of SM synthesis may favor ceramide accumulation by preventing the conversion of newly formed ceramide (derived from SM breakdown and/or *de novo* ceramide synthesis) into SM. Moreover, overexpressing SMS1 in HeLa cells altered FasL-induced ceramide generation and cell death, whereas transfection by siRNA against SMS1 sensitized HeLa cells to FasL. Thus, our data support the conclusion that SMS1 behaves as a key regulator of FasL-induced ceramide generation and cell death. In our study, total intracellular DAG levels were not significantly affected in

Jurkat and HeLa cells on FasL treatment (data not shown). However, the possibility that FasL triggers a selective decrease in the DAG pool localized at the Golgi cannot be ruled out. Indeed, a recent report indicates that an inhibition of SMS expression by siRNA in HeLa cells may affect DAG at the Golgi, whereas total DAG remains unchanged.³⁶

Stimulation of CD95 can activate neutral and acidic SMases, both of which catalyze SM breakdown to ceramide.³¹ Whereas there is no genetic evidence for (or against) a role of neutral SMases in CD95-mediated cell death, mutations in *Smpd1*, which encodes acidic SMase, have been associated with alterations of CD95 signaling both in human and mouse cells, suggesting a putative role of acidic SMase in CD95 signaling (for review, see Segui *et al.*¹¹). Whereas this matter is still debated,¹¹ this study proposes a novel mechanism that may contribute to SM decrease and ceramide increase in Fas signaling.

SMS inhibition occurred as early as 15 min after FasL treatment, whereas ceramide increase was detected after 1 h (see Figure 2b). There might be at least two explanations for this apparent discrepancy. First, during the first hour, despite SMS inhibition, ceramide did not accumulate because it can be metabolized by other sphingolipid metabolizing enzymes (such as GCS, which was not or poorly inhibited in Fas signaling; Supplementary Figure 2). This hypothesis is unlikely, as the ceramide produced on Fas cross-linking does not serve as a substrate for GCS.¹² A second possibility would be that subtle changes in the ceramide concentration in the Golgi apparatus, in which SMS1 resides, may not be detected either by the DAG kinase assay or by the mass spectrometry method, both of which evaluate the total intracellular ceramide. Only more pronounced changes could be detected at later time points.

Ceramide is considered as a bioactive molecule in cell death signaling, possibly acting as a modulator of membrane structure and dynamics.^{11,37} The cytotoxic mechanisms initiated by ceramide are not yet fully elucidated. The ceramide derived from cell-surface SM breakdown, as a consequence of acidic SMase secretion, has been proposed to be involved in Fas capping and DISC formation. Ceramide or its metabolites can also act intracellularly in signal transduction by activating mitochondrial events including cytochrome *c* and AIF release, as well as ROS production. As a matter of fact, low concentrations (5–10 μ M) of C16-ceramide triggered apoptosis in wild-type and in caspase-8-deficient (I9-2e cells) cells but not in caspase-9-deficient (JMR cells) Jurkat cells (Lafont, Dupont, Ségui, unpublished observation). Furthermore, ceramide can promote an increase in lysosomal membrane permeability, autophagic cell death and endoplasmic reticulum stress.¹¹ In this study, FasL-triggered caspase cascade activation was enhanced in SMS1 KD Jurkat cells and was partially inhibited in SMS1-overexpressing HeLa cells (see Figure 7). Although the processing of caspase-8 was not drastically changed by the modulation of SMS1 expression, the cleavage of initiator caspase-9 was markedly affected. Moreover, FasL-triggered cytochrome *c* release was significantly decreased in SMS1-overexpressing HeLa cells as compared with that in mock-transfected cells (data not shown). The latter observation indicates that the ceramide derived from the inhibition of SMS1 preferentially

affects the mitochondrial pathway and caspase-9 activation. The molecular link between mitochondria and a sphingolipid-metabolizing enzyme localized at the Golgi remains to be established. It has been recently reported that soon after Fas engagement, elements of the Golgi complex intermix with mitochondria in Jurkat cells.³⁸ Moreover, ceramide has been shown to trigger Golgi fragmentation.³⁹ Thus, it is tempting to speculate that the ceramide derived from the inhibition of SMS1 might contribute to Golgi fragmentation and intermix with mitochondria (or mitochondria-associated membranes). Whether ceramide increase, as a result of SMS inhibition, contributes to FasL-induced apoptosis remains to be demonstrated.

SMS2 was not as potent as SMS1 in negatively regulating FasL-induced apoptosis in HeLa cells (see Supplementary Figure 4). The overexpression of either SMS1 or SMS2 was accompanied by a similar increase in *in situ* SMS activity as compared with that in mock-transfected cells (see Supplementary Figure 4 and Figure 6). It is noteworthy that SMS2, but not SMS1, shows both SM and ceramide phosphoethanolamine synthase activity.⁴⁰ We cannot rule out the possibility that SMS2 dual activity modulates Fas signaling. Moreover, in sharp contrast to SMS1, SMS2 has been reported to be mainly localized at the plasma membrane.¹⁸ Thus, one can speculate that early SMS1 relocation (most likely as a consequence of Golgi fragmentation) in Fas signaling contributes to the inhibition of *de novo* SM synthesis, thereby enhancing apoptosis signaling. Finally, because SMS1 is able to modulate vesicular transport from the Golgi to the plasma membrane,³⁶ FasL, notably through SMS1 inhibition, may alter vesicular trafficking (an essential biological process for cell survival)⁴¹ and thereby enhance cell death.

In summary, inhibition of SM synthesis might facilitate FasL-induced ceramide increase and cell death in cancer cells. A working hypothesis is to consider that SMS1 inhibition occurs downstream of caspase-8 activation and that the subsequently accumulated ceramide enhances FasL-induced caspase-9 activation and cell death. In humans, SMS activity, together with GCS activity, is increased in chemoresistant leukemia cells.²² Interfering with SMS activity may represent an interesting therapeutic strategy to sensitize cells for the induction of apoptosis.

Materials and Methods

Reagents. Final concentrations or dilutions and sources of reagents were as follows: zVAD(OMe)-fmk (40 μ M) was purchased from Bachem (Voisins-Le-Bretonneux, France); polyclonal anti-SMS1 raised against a peptide derived from SMS1 was from Exalpha-Servibio (Meudon, France) and was used at 1:500 dilution; polyclonal anti-caspase-3 (10 μ g/ml) was obtained from Dako (Trappes, France); monoclonal anticaspase-8 (clone 1C12), polyclonal anticaspase-7 and polyclonal anti-PARP were purchased from Cell Signaling Technology (Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and were used at 1:1000 dilution; monoclonal anti-V5 (0.2 μ g/ml) was from Invitrogen (Cergy Pontoise, France); monoclonal anti- β -actin (clone AC-15; 5 μ g/ml) was from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). For microscopic analysis polyclonal anti-SMS1 raised against full-length recombinant SMS1 was from Exalpha-Servibio and was used at 1:50 dilution; anti-GM130 was from Santa Cruz Biotechnology-Tebu (Le Perray-en-Yvelines, France) and was used at 1:50 dilution; monoclonal anti-V5 was from Invitrogen and was used at 1:200 dilution. Anti-mouse, -rabbit and -goat IgGs conjugated with either Alexa 488, 633 or 647 were purchased from Molecular Probes Inc./Invitrogen and were used at 1:500 dilution. Human recombinant FasL was obtained from Abcys (Paris, France). Alternatively, mouse FasL produced in the supernatant of Neuro-2A cells stably

transfected with a plasmid encoding FasL⁴² was used. Similar data were obtained using mouse or human FasL.

Cell lines. Parental Jurkat T leukemia cells (A3) and derived cell lines deficient for caspase-8 (I9-2)⁴³ were kindly provided by Dr. J Blenis (Boston, MA, USA). I9-2d and I9-2e cells were isolated by limiting dilution experiments from I9-2 cells as previously described.⁹ Caspase-9-deficient Jurkat cells (clone JMR) were previously characterized.³² Jurkat cells were stably transduced by a retroviral vector encoding either a scrambled (ATTGAAAAAGACACGCGCC) (control cells) or human SMS1 siRNA (GCCCAACTGCGAAGAATAA) (SMS1 KD cells).³³ HeLa cells stably overexpressing human SMS1 harboring the V5 tag at the C terminus¹⁸ were kindly provided by Dr. J Holthuis (Utrecht, the Netherlands). The cells were transiently transfected with either 50 nM siRNA (siRNA On-Target SMARTpool) against SMS1 (Perbio, Brebières, France) or control (Non-Targeting SMARTpool) siRNA using Hiperfect reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France), following the manufacturer's instructions.

Analysis of mRNA expression. Total RNA was isolated from Jurkat cells using the Qiagen RNeasy kit and reverse transcribed using oligo(dT)₁₅ (Promega, Charbonnières, France) and Superscript II (Invitrogen), as recommended by the manufacturers. cDNAs were analyzed by quantitative real-time PCR using specific primers for SMS1, SMS2 and GAPDH (Qiagen) and the Power SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Mixtures were loaded in a TaqMan 7900 (Applied Biosystems) and amplification was performed according to the manufacturer's instructions. Alternatively, cDNAs were amplified by 30 PCR cycles using GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) and specific primers for SMS1 (forward primer: 5'-CATTTCACCTGTTCTCCGAAGC-3'; reverse primer: 5'-CCATAGTGTGATACCACCAG-3'), SMS2 (forward primer: 5'-TTAATCTGCTGGC TGCTGAG-3'; reverse primer: 5'-ACCAATCTTCTGAACCCGTG-3') and GAPDH (forward primer: 5'-AACATCATCCCTGCCTCTACTG-3'; reverse primer: 5'-TTGA CAAAGTGGCTGTGAGG-3'). cDNA prepared from human skin fibroblasts and vectors carrying human cDNA for SMS1 and SMS2 were used as positive controls. Amplifications were performed in a thermal cycler (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and amplification products were analyzed after migration into a 0.8% agarose gel, followed by ethidium bromide staining.

Flow cytometry analyses. Phosphatidylserine externalization was evaluated by labeling cells with Annexin V-FITC (250 ng/ml) and propidium iodide (12.5 µg/ml) (Immunotech, Marseille, France) for 10 min at 4°C. Analyses were performed on a FACScan cytometer (Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France).⁸

MTT assay. Viability was evaluated by the tetrazolium-based MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Cells were seeded in flat-bottom 96-well plates (10⁶ cells per ml, 100 µl per well) for indicated times at 37°C. MTT (0.5 mg/ml; Sigma) was added during the last 2 h. Formazan crystals were solubilized overnight at 37°C by adding 100 µl of solubilization buffer (0.01 N HCl, 10% SDS) and quantified spectrophotometrically using an ELISA reader ($\lambda = 560$ nm).

Protein extraction and western blotting analyses. For total protein extraction, 5 × 10⁶ cells were lysed for 30 min on ice in a buffer containing 50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, 1 mM NaVO₄, 10 µM β-glycerophosphate, 50 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml pepstatin A and 10 µg/ml aprotinin. Samples were centrifuged at 3500 × g at 4°C for 10 min. Supernatants were collected and protein content was determined by the Bradford method (Bio-Rad). For western blot analyses, equal amounts of proteins were separated on 12.5% SDS-PAGE.

Determination of *in situ* SMS and GCS activities. Jurkat cells (1 × 10⁶) were incubated in 1 ml RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum (FCS) and 2.5 µM C₆-NBD-ceramide (Sigma) solubilized in ethanol. After incubation at 37°C for 2 h, the reaction was stopped and lipids were extracted from the cells and the medium by adding 5 ml of chloroform/methanol (2 : 1, v/v). After centrifugation (1000 × g, 10 min), the lower phases were dried under nitrogen and resolved by analytical thin layer chromatography (TLC) developed in chloroform/methanol/30% ammonia (70 : 30 : 5, by vol). C₆-NBD-ceramide, C₆-NBD-GlcCer and C₆-NBD-SM were eluted from the silica and quantified spectrofluorometrically ($\lambda_{ex} = 470$ nm and $\lambda_{em} = 530$ nm).

Determination of *in vitro* SMS activity. Jurkat cell pellets were resuspended in water and briefly sonicated. Cell lysates (200 µg proteins) were incubated with 250 µl reaction buffer (50 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 1 mM EDTA). Liposomes (250 µl) containing 400 µM PC (Sigma) and 20 µM C₆-NBD-ceramide in BSA were added. After 1 h incubation at 37°C, the reaction was stopped by adding 2.5 ml chloroform/methanol (2 : 1, v/v). Fluorescent lipids were next analyzed by TLC as described earlier.

Cell-free assays of proteolysis. Cell pellets derived from HeLa cells overexpressing SMS1-V5 were resuspended in lysis buffer (10 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 42 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5% CHAPS, 1 mM PMSF, 2 µg/ml leupeptin). After a brief sonication and centrifugation (10 000 × g, 10 min), 200 µg proteins were incubated for 90 min at 37°C in the presence of three units (as defined by the manufacturer) of active recombinant caspases (Abcys). Alternatively, 100 ng of recombinant GST-tagged SMS1 (Abnova, Montluçon, France) was incubated for 90 min at 37°C in the presence of three units of active recombinant caspases in lysis buffer. The reaction was stopped by freezing the samples down on liquid nitrogen and proteins were analyzed by western blot.

Ceramide and diacylglycerol mass measurement. Lipids were extracted as described above. Ceramide mass was determined as previously reported⁴⁴ using *Escherichia coli* membranes as a source of DAG kinase (a kind gift from Dr. D Perry and Dr. YA Hannun; Charleston, NC, USA). Radioactive ceramide-1-phosphate and phosphatidic acid were isolated by TLC using chloroform/acetone/methanol/acetic acid/water (50 : 20 : 15 : 10 : 5, by vol) and then scraped before counting radioactivity by liquid scintillation.

Alternatively, ceramide was determined by liquid chromatography–mass spectrometry. Jurkat cells (5 × 10⁶) (clone A3) were sedimented, washed in PBS and transferred into glass vials. Sphingolipid extracts, fortified with internal standards, were prepared and analyzed by liquid chromatography–mass spectrometry using a Waters Aquity UPLC system connected to a Waters LCT Premier orthogonal accelerated time-of-flight mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA), operated in positive electrospray ionization mode under the conditions previously reported.⁴⁵

Metabolic labeling of sphingolipids. Cells (3 × 10⁶) were incubated for 48–72 h in the presence of 0.33 µCi/ml [³H]sphingosine (PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France) to label sphingolipids to equilibrium. Lipids were extracted and separated by TLC using chloroform/methanol/water (100 : 42 : 6, by vol). Radiolabeled sphingolipids were detected using a Berthold radiochromatogram scanner, identified using lipid standards and then scraped before counting radioactivity by liquid scintillation. Alternatively, 3 × 10⁶ cells were incubated for 48–72 h in the presence of 1 µCi/ml [³H]choline (PerkinElmer) to label SM and PC to equilibrium. The extracted SM and PC were separated by alkaline hydrolysis as previously described.⁴⁶

De novo SM synthesis. Cells (3 × 10⁶) were incubated in the presence of [³H]choline (1 µCi/ml) for 4 h to allow PC labeling and were further incubated for indicated times in the presence or absence of FasL. The cells were then sedimented at 4°C by low-speed centrifugation, and cell pellets were immediately frozen at –20°C. [³H]choline-labeled SM was next quantified after alkaline methanolysis as previously described.⁴⁶

Morphological analysis. Cells were half-diluted in a Trypan blue dye solution (0.4% in PBS) for 5 min and analyzed under a light microscope. At least 300 cells were examined and the percentage of cells exhibiting apoptotic nuclei (i.e., condensed and/or fragmented nuclei) was determined. The percentage of Trypan blue-positive cells did not increase during the first 4 h of incubation with FasL.

Alternatively, Jurkat and HeLa cells were grown on polylysine slides (VWR, Val de Fontenay, France) and glass coverslips, respectively. Cells were further incubated in the presence or absence of FasL as indicated, fixed in PBS containing 4% (w/v) paraformaldehyde for 15 min, permeabilized with PBS 0.1% (w/v) Triton X-100 for 15 min and counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 µg/ml) to visualize nuclei. ProLong Gold anti-fade reagent (Invitrogen) was used to mount coverslips on slides and cells were examined under a Leica (Wetzlar, Germany) fluorescence-equipped microscope using a × 40-oil objective. At least 300 cells were examined and the percentage of cells exhibiting apoptotic nuclei was determined.

Confocal microscopy. HeLa cells were grown on glass coverslips for 24 h in DMEM supplemented with 10% FCS. Cells were incubated for 1 h with or without 40 μ M zVAD-fmk and were further incubated for 8 h in the presence or absence of 125 ng/ml FasL. The indirect immunofluorescence protocol was carried out at room temperature as follows: cells were fixed in PBS containing 4% (w/v) paraformaldehyde for 15 min, permeabilized with PBS 0.1% (w/v) Triton X-100 for 15 min, washed in PBS and stained for 1 h with primary antibodies diluted in PBS. After several washes in PBS, appropriate secondary antibodies were added for 1 h. Cells were also counterstained with DAPI (1 μ g/ml) to visualize nuclei. ProLong Gold anti-fade reagent (Invitrogen) was used to mount coverslips. The cells were examined under a Zeiss (Göttingen, Germany) 510 confocal microscope using \times 63-oil objective lens.

Statistical analysis. Results are expressed as means \pm S.E.M. of at least three independent determinations per experiment. Mean values were compared using Student's *t*-test. Differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$ (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; NS: not significant).

Acknowledgements. We thank Dr. J Blenis (Boston, MA, USA) for providing A3 and I9-2 Jurkat cells. We also thank Dr. J Holthuis (Utrecht, the Netherlands) for the kind gift of HeLa cells overexpressing either SMS1-V5 or SMS2-V5. We are grateful to Dr. G Fabrias and Dr. J Casas (Barcelona, Spain) for mass spectrometry analysis of ceramide and for fruitful discussion. We thank E Dalmou, P Clavé, N Therville, JC Lepert, JC Thiers and B Payre for excellent technical assistance. We thank Dr N Andrieu-Abadie, Dr. SC Sorli and Dr. JP Jaffrézou for critical reading of the paper. This study was supported by INSERM, Paul Sabatier University, Grant 3417 from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) (to BS) and by a grant from Ligue Nationale contre le Cancer and les comités départementaux du Gers, de l'Aveyron et de la Haute-Garonne (to JP Jaffrézou's group).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

- Rieux-Laucat F, Le Deist F, Fischer A. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death Differ* 2003; **10**: 124–133.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ *et al*. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998; **17**: 1675–1687.
- Muzio M, Salvesen GS, Dixit VM. FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem* 1997; **272**: 2952–2956.
- Vincenz C, Dixit VM. Fas-associated death domain protein interleukin-1 β -converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling. *J Biol Chem* 1997; **272**: 6578–6583.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J *et al*. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996; **85**: 817–827.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; **94**: 491–501.
- Luo X, Budiardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome *c* release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; **94**: 481–490.
- Milhas D, Cuvillier O, Therville N, Clave P, Thomsen M, Levade T *et al*. Caspase-10 triggers bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2005; **280**: 19836–19842.
- Fischer U, Stroh C, Schulze-Osthoff K. Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene* 2006; **25**: 152–159.
- Lee KH, Feig C, Tchikov V, Schickel R, Hallas C, Schutze S *et al*. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J* 2006; **25**: 1009–1023.
- Ségui B, Andrieu-Abadie N, Jaffrezou JP, Benoit H, Levade T. Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1758**: 2104–2120.
- Tepper AD, Diks SH, van Blitterswijk WJ, Borst J. Glucosylceramide synthase does not attenuate the ceramide pool accumulating during apoptosis induced by CD95 or anti-cancer regimens. *J Biol Chem* 2000; **275**: 34810–34817.
- Watanabe M, Kitano T, Kondo T, Yabu T, Taguchi Y, Tashima M *et al*. Increase of nuclear ceramide through caspase-3-dependent regulation of the 'sphingomyelin cycle' in Fas-induced apoptosis. *Cancer Res* 2004; **64**: 1000–1007.
- Bourteele S, Hausser A, Doppler H, Horn-Müller J, Ropke C, Schwarzmann G *et al*. Tumor necrosis factor induces ceramide oscillations and negatively controls sphingolipid synthases by caspases in apoptotic Kym-1 cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 31245–31251.
- Separovic D, Hanada K, Maitah MY, Nagy B, Hang I, Tainsky MA *et al*. Sphingomyelin synthase 1 suppresses ceramide production and apoptosis post-photodamage. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **358**: 196–202.
- Separovic D, Semaan L, Tarca AL, Awad Maitah MY, Hanada K, Bielawski J *et al*. Suppression of sphingomyelin synthase 1 by small interference RNA is associated with enhanced ceramide production and apoptosis after photodamage. *Exp Cell Res* 2008; **314**: 1860–1868.
- Charruyer A, Bell SM, Kawano M, Douangpanya S, Yen TY, Macher BA *et al*. Decreased ceramide transport protein (CERT) function alters sphingomyelin production following UVB irradiation. *J Biol Chem* 2008; **283**: 16682–16692.
- Huitema K, van den Dikkenberg J, Brouwers JF, Holthuis JC. Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J* 2004; **23**: 33–44.
- Yamaoka S, Miyaji M, Kitano T, Umehara H, Okazaki T. Expression cloning of a human cDNA restoring sphingomyelin synthesis and cell growth in sphingomyelin synthase-defective lymphoid cells. *J Biol Chem* 2004; **279**: 18688–18693.
- Luberto C, Hannun YA. Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation. Does sphingomyelin synthase account for the putative phosphatidylcholine-specific phospholipase C? *J Biol Chem* 1998; **273**: 14550–14559.
- Tafesse FG, Huitema K, Hermansson M, van der Poel S, van den Dikkenberg J, Uphoff A *et al*. Both sphingomyelin synthases SMS1 and SMS2 are required for sphingomyelin homeostasis and growth in human HeLa cells. *J Biol Chem* 2007; **282**: 17537–17547.
- Itoh M, Kitano T, Watanabe M, Kondo T, Yabu T, Taguchi Y *et al*. Possible role of ceramide as an indicator of chemoresistance: decrease of the ceramide content via activation of glucosylceramide synthase and sphingomyelin synthase in chemoresistant leukemia. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 415–423.
- Yang Z, Khoury C, Jean-Baptiste G, Greenwood MT. Identification of mouse sphingomyelin synthase 1 as a suppressor of Bax-mediated cell death in yeast. *FEMS Yeast Res* 2006; **6**: 751–762.
- Kilkus JP, Goswami R, Dawson SA, Testai FD, Berdyshev EV, Han X *et al*. Differential regulation of sphingomyelin synthesis and catabolism in oligodendrocytes and neurons. *J Neurochem* 2008; **106**: 1745–1757.
- Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M *et al*. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 2003; **426**: 803–809.
- Swanton C, Marani M, Pardo O, Warne PH, Kelly G, Sahai E *et al*. Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapeutic drugs. *Cancer Cell* 2007; **11**: 498–512.
- Van der Luit AH, Budde M, Zerp S, Caan W, Klarenbeek JB, Verheij M *et al*. Resistance to alkyl-lysophospholipid-induced apoptosis due to downregulated sphingomyelin synthase 1 expression with consequent sphingomyelin- and cholesterol-deficiency in lipid rafts. *Biochem J* 2007; **401**: 541–549.
- Miyaji M, Jin ZX, Yamaoka S, Amakawa R, Fukuhara S, Sato SB *et al*. Role of membrane sphingomyelin and ceramide in platform formation for Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med* 2005; **202**: 249–259.
- Ding T, Li Z, Hailiemariam T, Mukherjee S, Maxfield FR, Wu MP *et al*. SMS overexpression and knockdown: impact on cellular sphingomyelin and diacylglycerol metabolism, and cell apoptosis. *J Lipid Res* 2008; **49**: 376–385.
- Hailiemariam TK, Huan C, Liu J, Li Z, Roman C, Kalbfeisch M *et al*. Sphingomyelin synthase 2 deficiency attenuates NF κ B activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28**: 1519–1526.
- Cifone MG, Roncaoli P, De Maria R, Camarda G, Santoni A, Ruberti G *et al*. Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal. *EMBO J* 1995; **14**: 5859–5868.
- Samraj AK, Keil E, Ueffing N, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2006; **281**: 29652–29659.
- Jin ZX, Huang CR, Dong L, Goda S, Kawanami T, Sawaki T *et al*. Impaired TCR signaling through dysfunction of lipid rafts in sphingomyelin synthase 1 (SMS1)-knockdown T cells. *Int Immunol* 2008; **20**: 1427–1437.
- Walker A, Ward C, Sheldrake TA, Dransfield I, Rossi AG, Pryde JG *et al*. Golgi fragmentation during Fas-mediated apoptosis is associated with the rapid loss of GM130. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **316**: 6–11.
- Gulbins E, Kolesnick R. Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene* 2003; **22**: 7070–7077.
- Villani M, Subathra M, Im YB, Choi Y, Signorelli P, Del Poeta M *et al*. Sphingomyelin synthases regulate production of diacylglycerol at the Golgi. *Biochem J* 2008; **414**: 31–41.
- van Blitterswijk WJ, van der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M, Borst J. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem J* 2003; **369**: 199–211.
- Quasti S, Matarrese P, Paddon R, Khosravi-Far R, Sorice M, Tinari A *et al*. Death receptor ligation triggers membrane scrambling between Golgi and mitochondria. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 453–461.
- Hu W, Xu R, Zhang G, Jin J, Szulc ZM, Bielawski J *et al*. Golgi fragmentation is associated with ceramide-induced cellular effects. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 1555–1567.

40. Temes P, Brouwers JF, van den Dikkenberg J, Holthuis JC. Sphingomyelin synthase SMS2 displays dual activity as ceramide phosphoethanolamine synthase. *J Lipid Res* 2009 (in press).
41. Bankaitis VA, Morris AJ. Lipids and the exocytotic machinery of eukaryotic cells. *Curr Opin Cell Biol* 2003; **15**: 389–395.
42. Shimizu M, Fontana A, Takeda Y, Yagita H, Yoshimoto T, Matsuzawa A. Induction of antitumor immunity with Fas/APO-1 ligand (CD95L)-transfected neuroblastoma neuro-2a cells. *J Immunol* 1999; **162**: 7350–7357.
43. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* 1998; **8**: 1001–1008.
44. Van Veldhoven PP, Matthews TJ, Bolognesi DP, Bell RM. Changes in bioactive lipids, alkylacylglycerol and ceramide, occur in HIV-infected cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **187**: 209–216.
45. Munoz-Olaya JM, Matabosch X, Bedia C, Egido-Gabas M, Casas J, Liebaria A *et al*. Synthesis and biological activity of a novel inhibitor of dihydroceramide desaturase. *ChemMedChem* 2008; **3**: 946–953.
46. Segui B, Andrieu-Abadie N, Adam-Klages S, Meilhac O, Kreder D, Garcia V *et al*. CD40 signals apoptosis through FAN-regulated activation of the sphingomyelin–ceramide pathway. *J Biol Chem* 1999; **274**: 37251–37258.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

II.2. Conclusion de l'article 2 :

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la SMS1, seule isoforme exprimée dans les cellules Jurkat, est inhibée dès 15 minutes après le début de la stimulation par CD95L, en fonction du temps et de la dose. Le début de cette inhibition est antérieur à l'élévation de céramide et à la diminution du taux de SM, elles-mêmes concomitantes à l'apparition de noyaux à morphologie apoptotique. Ceci indique que cette inhibition n'est pas une simple résultante de la mort cellulaire. De plus, l'inhibition de l'activité de synthèse de SM est un événement relativement proximal dans la signalisation de CD95, étant donné qu'elle a lieu en aval de l'activation de la caspase 8 mais en amont de celle de la caspase 9. La SMS1, qui est une enzyme Golgienne, subit une relocalisation dans le cytoplasme dans des cellules présentant une condensation chromatinienne tandis qu'elle n'est plus détectée dans des cellules à noyaux fragmentés. Ces différents phénomènes sont également observés pour la protéine Golgienne GM130, avec laquelle la SMS1 est colocalisée. Par ailleurs, la SMS1 est clivée au cours de l'apoptose et les caspases 2, 8, 9 et 7, mais pas les caspases 3 et 10, pourraient être responsables de ce clivage. Ces différentes données indiquent ainsi que la SMS1 est une enzyme qui est soumise au démantèlement de l'organite dans lequel elle réside au cours de l'apoptose, ce qui pourrait participer à une diminution de l'accessibilité de ses substrats, et donc à une inhibition de l'activité de synthèse de SM par défaut de substrat. Des données supplémentaires indiquent également que la synthèse de phosphatidylcholine, substrat des SMS, est également inhibée en présence de CD95L, ce qui constitue un second mécanisme d'inhibition de l'activité SMS. Par ailleurs, cette enzyme est clivée de façon caspase-dépendante au cours de l'apoptose, ce qui pourrait potentiellement avoir un effet inhibiteur sur son activité enzymatique spécifique. Ces différents phénomènes, sans en être nécessairement les seuls responsables, pourraient donc contribuer à l'inhibition de l'activité de synthèse de la SM dépendante de CD95.

La modulation de l'expression de la SMS1 dans deux modèles de cellules cancéreuses nous a permis de mettre en évidence son rôle fonctionnel dans la signalisation de CD95. Ainsi, la diminution de l'expression de la SMS1 dans des cellules Jurkat favorise l'accumulation de céramide, l'activation des caspases, en particulier des caspases 9 et 3 et l'apoptose dépendante de CD95. A l'inverse, la surexpression de la SMS1 dans des cellules HeLa inhibe l'élévation de céramide, l'activation des caspases, en particulier des caspases 9 et 3, et l'apoptose dépendantes de CD95. Par ailleurs, la diminution de l'expression de la SMS1

endogène sensibilise également des cellules parentales HeLa à l'apoptose induite par CD95L. Ces observations suggèrent donc que moduler l'expression de la SMS1 est un moyen de réguler l'apoptose induite par CD95L dans deux types de cellules cancéreuses. Des données supplémentaires indiquent que la surexpression de la SMS2 n'induit pas de résistance significative à l'apoptose induite par CD95L dans des cellules HeLa. Toutefois, la diminution de l'expression de la SMS2 dans des cellules qui la surexpriment permet de les sensibiliser. La différence d'effet des SMS1 et 2 sur la signalisation de CD95 pourrait s'expliquer par leur différence de localisation cellulaire. Ainsi la SMS2 régule le pool de SM situé au niveau de la membrane plasmique tandis que la SMS1 est responsable de la synthèse de la SM Golgienne. Des variations des taux des différents lipides, substrats ou produits de la réaction, dans un compartiment subcellulaire particulier pourraient donc avoir un rôle particulièrement important dans la modulation de la réponse à CD95L. Par ailleurs, selon les expériences d'interférence à l'ARN réalisées dans cette étude et d'après les données de la littérature, la SMS1 est responsable de 60% de l'activité de synthèse de SM contre 40% pour la SMS2 dans les cellules HeLa, ce qui pourrait expliquer également l'effet plus modéré de la modulation de l'expression de cette dernière enzyme. Enfin, la SMS2, contrairement à la SMS1, possède également une seconde activité enzymatique de synthèse de céramide phosphoéthanolamine qui pourrait, elle aussi, avoir une influence différente vis-à-vis de la signalisation de CD95.

Concernant les mécanismes possibles de la modulation de la signalisation de CD95 par la SMS1, nous avons observé dans cette étude que l'activation des caspases 9 et 3 étaient particulièrement modifiées en réponse à CD95L suite à la modulation de l'expression de la SMS1, suggérant que l'intensité de l'activation de la voie mitochondriale soit plus particulièrement modulée par cette activité enzymatique. Par ailleurs, l'équipe du Dr Patrick Legembre, avec lequel nous collaborons, a mis en évidence que les cellules HeLa surexprimant la SMS1 présentaient une formation du DISC de CD95 diminuée en comparaison à des cellules contrôles (Figure 24). Ceci suggère que l'effet inhibiteur de l'expression de cette enzyme sur cette signalisation pourrait en partie être dû à une modulation d'un ou plusieurs événements précoces.

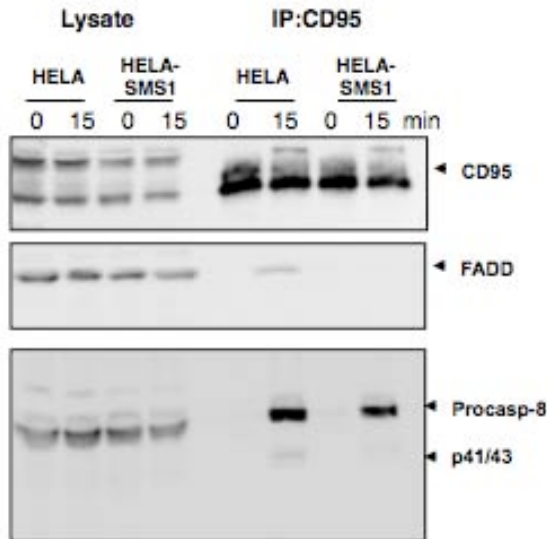


Figure 24 : Les HeLa SMS1 présentent une diminution de la formation du DISC de CD95. 20.10⁶ cellules ont été stimulées à 4°C (0 min) ou à 37°C (15 min) avec 1 µg/ml d'anticorps agoniste anti-CD95 monoclonal anti-APO 1-3 puis lysées. CD95 a été immunoprécipité avec des billes recouvertes de protéine A et le complexe moléculaire associé à été analysé par électrophorèse (10% SDS-PAGE). Les anticorps utilisés sont indiqués. 20 µl de lysat total ont été déposés comme contrôle de quantité de protéine (Données de l'équipe du Dr Patrick Legembre).

Nos résultats indiquent que la sphingomyéline synthase 1 est un substrat des caspases fonctionnellement impliqué dans l'apoptose dépendante de CD95 dans les cellules Jurkat et HeLa. Comme évoqué dans la revue générale, il existerait deux grands groupes de types cellulaires, les cellules de type I et les cellules de type II (dont les cellules Jurkat et HeLa), qui diffèrent par plusieurs aspects dans la signalisation de CD95. Etant donné que la régulation du taux de céramide et des sphingolipides plus complexes, dont la SM, par plusieurs enzymes du métabolisme sphingolipidique influence la signalisation de CD95, nous avons réalisé des expériences préliminaires afin de déterminer si les cellules de type I ou II peuvent également être distingués selon leur métabolisme sphingolipidique. Des premiers résultats d'évaluation globale du métabolisme sphingolipidique par marquage métabolique à la sphingosine tritiée indiquent que les cellules de type I H9 et SKW6.4 convertissent moins de sphingosine tritiée en divers sphingolipides que les cellules de type II Jurkat et CEM (Figure 25). Aucune distinction ne pouvait, à l'inverse, être réalisée en fonction des taux de SM, GlcCer, LacCer ou céramide entre les deux groupes de cellules. Par ailleurs, le taux de deux espèces de sphingolipides, des gangliosides ne pouvant être clairement identifiés par ce protocole expérimental, semble varier de façon opposée dans les cellules de type I et de type II (Figure 26).

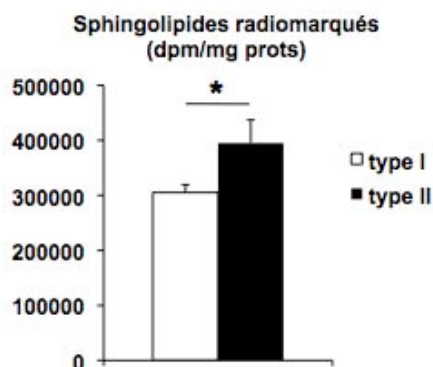


Figure 25 : La conversion de la sphingosine en sphingolipides est inférieure dans les cellules de type I par rapport aux cellules de type II. 500 000 cellules Jurkat, H9, SW6.4 et CEM sont incubées en présence de [3H]-sphingosine (0,25 μ Ci/ml) (PerkinElmer), un précurseur de la synthèse des sphingolipides, pendant 48 heures pour marquer les sphingolipides à l'équilibre. Des culots cellulaires sont ensuite réalisés. Les lipides sont extraits à partir des culots cellulaires. Les résidus lipidiques sont repris par 20 μ l de chloroforme/méthanol (2 :1, v/v) puis séparés par chromatographie sur couche mince dans un système de migration contenant chloroforme/méthanol/eau (100:42:6, v/v/v). La distribution des sphingolipides radiomarqués sur la plaque de chromatographie est analysée grâce à un radiochromatoscanner (Bertold). Les différents sphingolipides sont ensuite quantifiés par scintillation. Les données sont des moyennes \pm E.S.M de 2 à 3 expériences indépendantes sur chacune des lignées (2 de type I et 2 de type II).

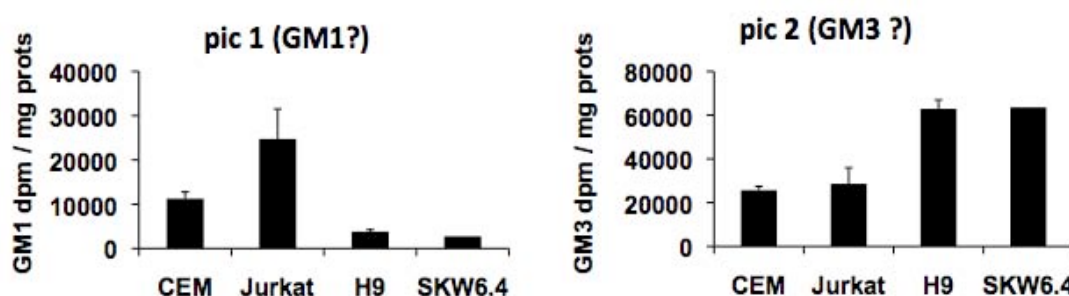


Figure 26 : Les cellules de type I et II présentent des différences de synthèse de certains glycosphingolipides. Les données sont des moyennes \pm E.S.M de 2 à 3 expériences indépendantes sur chacune des lignées.

Il serait intéressant d'une part d'identifier les gangliosides qui varient entre ces deux groupes de cellules, et d'autre part de réaliser une analyse plus exhaustive des glycosphingolipides ainsi que de poursuivre ces expériences dans d'autres cellules de type I et II, afin de déterminer si il s'agit de différences retrouvées de façon systématique entre les deux types cellulaires. Nous avons également évalué l'activité de synthèse de SM et de GlcCer *in vitro* dans les différents types cellulaires. Alors que l'activité GCS ne semble pas être différente entre les cellules de type I et de type II, l'activité de synthèse de SM est augmentée de façon significative dans les cellules de type I comparées aux cellules de type II (Figure 27). Bien

que ceci ne semble pas avoir d'impact sur la production de SM en basal, puisqu'aucune différence de contenu en SM radiomarquée évaluée par marquage à la sphingosine tritiée n'a pu être détectée (données non montrées), il est envisageable que ceci soit important dans le cas de stress cellulaires au cours desquels les taux de substrats peuvent varier. Il pourrait donc être intéressant d'évaluer également le métabolisme des sphingolipides de façon plus exhaustive et précise par spectrométrie de masse, dans ces différents types de cellules et en condition de stress cellulaire, notamment sous CD95L ou d'autres ligands de DR.

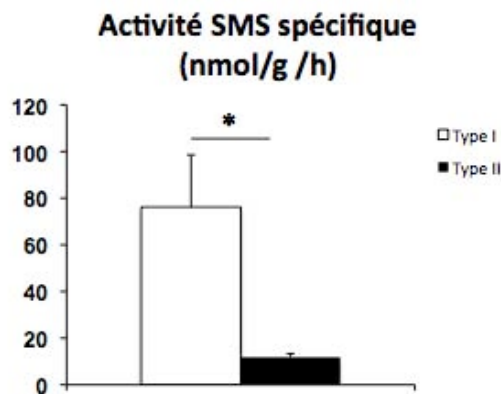


Figure 27 : Les cellules de type I ont une activité spécifique de synthèse de SM plus élevée que les cellules de type II. Les données sont des moyennes +/- E.S.M de 6 expériences indépendantes (3 pour chaque lignée).

III. La sphingomyéline synthase 1 inhibe l'apoptose induite par TRAIL dans les cellules cancéreuses.

III.1. Contexte de l'étude :

Plusieurs études indiquent que des élévations de céramide, attribuées à la modulation de différentes enzymes du métabolisme des sphingolipides, seraient impliquées et amplifieraient l'apoptose dépendante de TRAIL dans les cellules sensibles. L'équipe d'Erich Gulbins a suggéré que l'activation d'une SMase acide était nécessaire à la formation de plateformes enrichies en céramide qui favorisent le clustering de DR5 et l'induction d'apoptose dans différentes lignées cellulaires en réponse à TRAIL (Dumitru & Gulbins, 2006). Ainsi, des splénocytes déficients en SMase acide résistent à l'apoptose induite par TRAIL. Par ailleurs, le traitement de cellules par la doxorubicine permet de les resensibiliser *via* l'activation d'une SMase acide (Dumitru *et al.*, 2007). En outre, des cellules de métastase d'adénocarcinome de colon SW620, résistantes à TRAIL, peuvent être sensibilisées *via* l'ajout de céramide exogène (Voelkel-Johnson *et al.*, 2005). Ces cellules expriment un niveau plus faible de Ceramide Synthase 6, une des enzymes responsables de la synthèse *de novo* de céramide, que la lignée de tumeur primaire correspondante SW480 sensible à TRAIL. La surexpression de cette enzyme dans les SW620 permet de restaurer l'élévation de C16-céramide et l'apoptose induite par TRAIL, tandis que l'utilisation de siRNA dirigé contre la Ceramide synthase 6 rend les cellules résistantes (White-Gilbertson *et al.*, 2009). Ces différentes études indiquent donc que la modulation de l'accumulation de céramide en réponse à TRAIL pourrait jouer un rôle fonctionnel dans la signalisation apoptotique émanant de ses récepteurs agonistes. Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence que le pré-traitement de cellules cancéreuses par des molécules de chimiothérapie permettait de les sensibiliser à l'apoptose induite par TRAIL, *via* différents mécanismes (cf. chapitre I.2.7.3. de la revue générale). Ainsi, il a été observé que plusieurs types de molécules de chimiothérapie induisent une accumulation de céramide dans les cellules sensibles *via* la modulation de l'activité de plusieurs enzymes du métabolisme sphingolipidique. La génération de céramide pourrait également moduler des morts non apoptotiques émanant des TRAILRs. Ainsi, la surexpression d'une céramidase acide confère une résistance à des cellules de fibrosarcome murin L929 vis-à-vis de la mort induite par TRAIL en présence d'inhibiteur de caspase (Thon *et al.*, 2006).

Nous avons mis en évidence précédemment que la SMS1 est un substrat des caspases fonctionnellement impliqué dans l'apoptose dépendante de CD95. Nous avons donc cherché à évaluer dans cette étude si, et comment, la synthèse de SM pouvait être impliquée dans la modulation de la signalisation apoptotique induite par TRAIL. Par ailleurs, nous avons également déterminé si la synthèse de SM pouvait moduler l'effet sensibilisateur à TRAIL de certaines molécules de chimiothérapie.

III.2. Résultats préliminaires et perspectives expérimentales :

La SMS1 joue un rôle anti-apoptotique dans la signalisation des TRAILRs dans les cellules HeLa et Hct 116.

Nous avons d'abord utilisé les cellules HeLa SMS1-V5 et contrôles précédemment caractérisées (cf. article 2) (Tafesse *et al.*, 2007) (Figure 28A). Ces cellules, qui présentent une activité spécifique de synthèse de SM significativement augmentée (Figure 28B), résistent de façon significative à l'apoptose induite par TRAIL (Figure 28C) et la perte de viabilité induite par TRAIL est inhibée, quelque soit la concentration de TRAIL testée (Figure 28D). Afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas là d'un effet purement limité à deux populations cellulaires particulières, nous avons testé l'effet de la surexpression stable d'une SMS1 étiquetée VSV dans une autre population de cellules HeLa. Les cellules HeLa II SMS1 ainsi générées surexpriment une forme de SMS1 migrant à environ 43 kDa. Par ailleurs, une seconde bande, d'environ 34 kDa, qui pourrait correspondre à un produit de clivage de la SMS1 surexprimée, est également observée (Figure 28E). Ces cellules présentent également une élévation significative de l'activité spécifique de synthèse de SM par rapport aux HeLa II cnt (données non montrées). De façon comparable à ce qui est observé dans la population HeLa SMS1, les HeLa II SMS1 résistent de façon significative à l'apoptose induite par TRAIL en comparaison aux HeLa II cnt (Figure 28F). Ces différents résultats suggèrent donc, que de façon comparable à ce que nous avons observé pour la signalisation de CD95, la SMS1 jouerait un rôle anti-apoptotique dans celle induite par TRAIL.

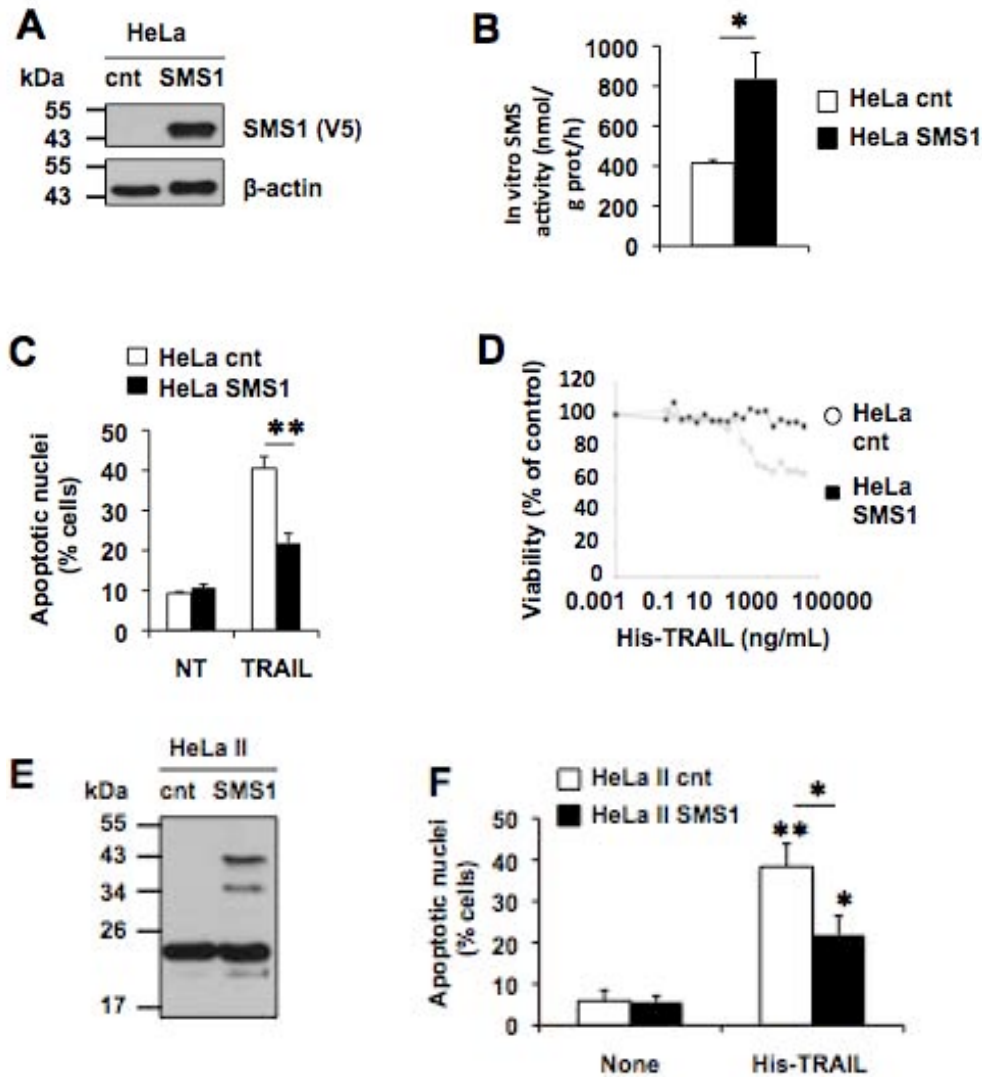


Figure 28 : La surexpression de la SMS1 inhibe l'apoptose dépendante de TRAIL dans les cellules HeLa. **A.** Western blot sur 20 μg de protéines d'extraits cellulaires de cellules HeLa transfectées avec un plasmide pcDNA3.1 vide contrôle (cnt) ou surexprimant une SMS1 étiquetée V5 (SMS1) avec un anticorps anti-V5 et un anti-β-actine. **B.** L'activité SMS spécifique de 100 μg d'extraits protéiques de cellules HeLa SMS1 ou cnt a été évaluée. Les données correspondent à la moyenne ± E.S.M de 4 expériences indépendantes. **C.** Les cellules HeLa SMS1 et cnt ont été incubées pendant 8 heures en présence, ou non, de 100 ng/mL de TRAIL et la proportion de cellules présentant des noyaux apoptotiques (condensés ou fragmentés) a été évaluée. Les données sont des moyennes ± E.S.M de 3 expériences indépendantes. **D.** Les lignées HeLa SMS1 et cnt ont été incubées en présence de His-TRAIL pendant 8h aux concentrations indiquées et la viabilité cellulaire a été évaluée par coloration au bleu de méthylène. Les données correspondent à une expérience représentative de 3. **E.** Western blot sur 20 μg d'extraits protéiques de cellules HeLa infectées pour exprimer une SMS1 étiquetée VSV (HeLa II SMS1) ou contrôles (HeLa II cnt) avec un anticorps anti-VSV. **F.** Les cellules HeLa II SMS1 ou HeLa II cnt ont été incubées en présence, ou non, d'His-TRAIL (50 ng/mL) pendant 8 heures. La proportion de cellules à noyaux apoptotiques a été évaluée par microscopie. Les données sont des moyennes ± E.S.M de 4 expériences indépendantes.

Nous avons ensuite évalué l'impact d'une diminution d'expression de la SMS1 dans la mort induite par TRAIL. Selon un protocole validé précédemment (cf. article 2), les cellules HeLa SMS1 ont été transfectées de façon transitoire avec un siRNA dirigé contre la SMS1,

induisant une diminution d'expression nette de la SMS1-V5 (Figure 29A). Cette diminution d'expression sensibilise significativement des cellules HeLa SMS1 (Figure 29B), à l'apoptose induite par TRAIL. Par ailleurs, la même stratégie permet de diminuer l'activité de synthèse de SM endogène de façon significative dans des cellules HeLa WT (cf. article 2) et de les sensibiliser à l'apoptose induite par TRAIL (Figure 29C). Ces résultats indiquent donc que la SMS1 endogène joue aussi un rôle anti-apoptotique dans la signalisation de TRAIL dans les cellules HeLa.

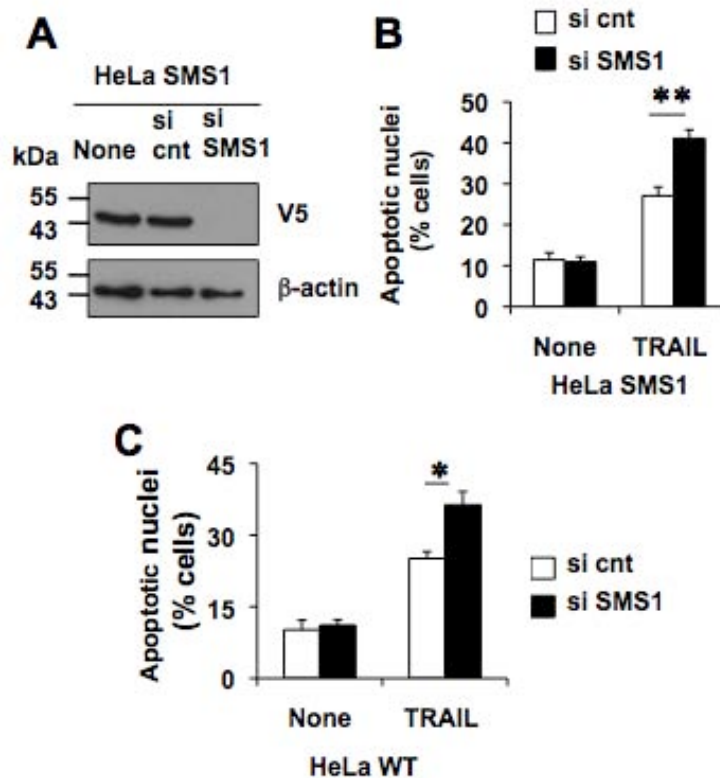


Figure 29 : La diminution d'expression de la SMS1 sensibilise les cellules HeLa à l'apoptose induite par TRAIL. A et B. Les cellules HeLa SMS1 ont été transfectées avec un siRNA contrôle (si cnt) ou dirigé contre la SMS1 (si SMS1) et incubées pendant 72h. **A.** Western blot sur 20 μ g d'extraits protéiques de HeLa SMS1 avec un anticorps anti-V5 et anti- β -actine. **B.** Les cellules ont ensuite été incubées pendant 8h en présence, ou non, de TRAIL (5 ng/mL). La proportion de cellules présentant un noyau à morphologie apoptotique a été évaluée au microscope. Les données sont des moyennes \pm E.S.M. de 3 à 6 expériences indépendantes. **C.** Des cellules HeLa sauvages ont été transfectées avec un siRNA contrôle (si cnt) ou dirigé contre la SMS1 (si SMS1) et incubées pendant 72h. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 8h en présence, ou non, de TRAIL (5 ng/mL). Les données sont des moyennes \pm E.S.M. de 3 à 6 expériences indépendantes.

Nous avons ensuite évalué si la modulation de l'expression de la SMS1 pouvait influencer la mort cellulaire dépendante des TRAILRs dans d'autres lignées cellulaires cancéreuses. L'expression stable de la SMS1 étiquetée V5 dans des cellules Hct116 d'adénocarcinome colique induit l'apparition de deux formes de la protéine, l'une migrant

aux alentours de 43 kDa, et l'autre à environ 34 kDa, de façon similaire à l'expression observée précédemment dans les HeLa II SMS1 (Figure 30A), et s'accompagne également d'une élévation significative d'activité (Figure 30B). Les cellules Hct SMS1 présentent une résistance, moins marquée que les cellules HeLa SMS1, mais toutefois significative, à la mort induite par TRAIL pour des doses d'His-TRAIL de 20 à 500 ng/mL (Figure 30C). Par ailleurs, la diminution de l'expression de la SMS1 par interférence à l'ARN permet également de diminuer efficacement l'expression de la SMS1 étiquetée VSV (Figure 30D) et sensibilise significativement les cellules à l'apoptose induite par TRAIL (Figure 30E). Ainsi, la surexpression de la SMS1 permet de conférer une résistance à différents types de cellules cancéreuses, tandis que la diminution de son expression les sensibilise.

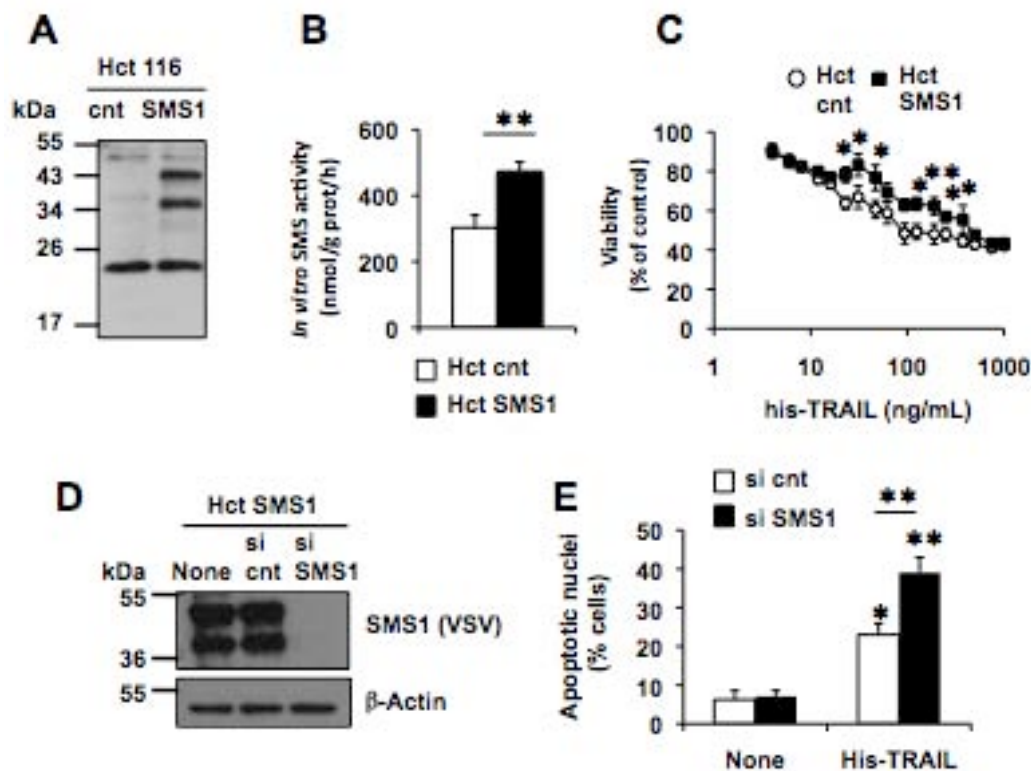


Figure 30. La SMS1 est anti-apoptotique dans la signalisation induite par TRAIL dans les Hct 116. **A.** Western blot réalisé sur 20 µg d'extraits protéiques de cellules Hct 116 contrôles (cnt) ou surexprimant la SMS1 étiquetée VSV (SMS1), en utilisant un anticorps anti-VSV. **B.** L'activité spécifique de synthèse de SM a été mesurée sur 100 µg d'extraits protéiques de cellules Hct cnt ou SMS1. Les données sont des moyennes ± E.S.M. de 4 expériences indépendantes. **C.** Les cellules Hct cnt ou SMS1 ont été incubées avec différentes doses de His-TRAIL pendant 16 heures. La viabilité cellulaire a été évaluée par test MTT. Les résultats sont exprimés en pourcentage des cellules non traitées. Les données sont des moyennes ± S.E.M. de 6 expériences indépendantes. **D et E.** Les cellules Hct SMS1 ont été transfectées avec un siRNA contrôle (cnt) ou dirigé contre la SMS1 (siSMS1) et incubées pendant 72 heures. **D.** Western blot sur 20 µg d'extraits protéiques de cellules Hct SMS1 réalisé avec un anticorps anti-VSV et un anti-β-actine. **E.** Les cellules ont ensuite été incubées pendant 8 heures en présence, ou non de 20 ng/mL d'His-TRAIL. La proportion des cellules ayant des noyaux à morphologie apoptotique a été évaluée par microscopie. Les données sont des moyennes ± S.E.M. de 4 expériences indépendantes

L'expression de la SMS1 contrecarre l'effet inhibiteur de TRAIL sur la clonogénicité en agar.

La capacité de résistance à la mort cellulaire par apoptose est une des caractéristiques des cellules cancéreuses. Une autre caractéristique permettant de définir la malignité cellulaire est leur capacité à croître en absence d'ancrage. Nous avons donc cherché à évaluer si l'expression de la SMS1 pouvait aussi avoir un impact sur cette propriété des cellules cancéreuses, en présence, ou non, de TRAIL qui limite la formation de clones en agar. Nous avons observé, d'une part que la surexpression de la SMS1 dans les cellules HeLa augmente significativement la formation de clones en agar en l'absence de TRAIL et, d'autre part, que TRAIL inhibe la formation de clones de cellules HeLa cnt, tandis que cet effet inhibiteur est moindre dans les cellules surexprimant la SMS1 (Figures 31A et B). Nous avons cherché à évaluer l'effet de la diminution de l'expression de la SMS1 sur la formation de clones en présence, ou non, de TRAIL. Pour cela, nous avons transfecté des cellules HeLa surexprimant la SMS1 de façon transitoire avec un siRNA dirigé contre la SMS1 ou un siRNA contrôle 24 heures avant de les ensemercer dans le milieu contenant de l'agar. Le siRNA SMS1 induit une diminution d'expression de la SMS1 au moins jusqu'à J5 et l'effet d'inhibition de l'expression est perdu à J7 (Figure 31C). La diminution de l'expression de la SMS1 n'a pas d'effet sur la formation de clones en basal mais favorise significativement l'inhibition de la formation de clones induite par TRAIL (Figure 31D).

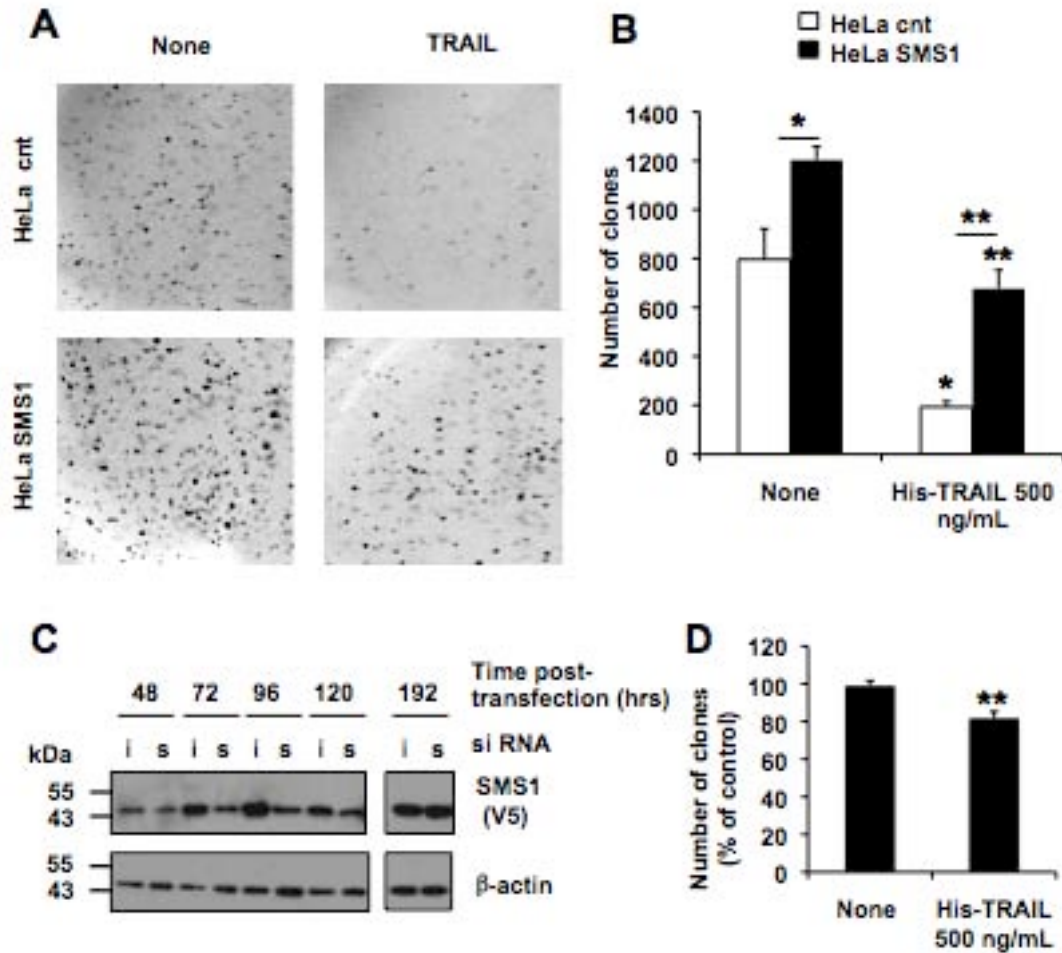


Figure 31 : La SMS1 contrecarre l'effet inhibiteur de TRAIL sur la formation de colonie en agar. A-B. Les cellules HeLa cnt et SMS1 ont été ensemencées dans du milieu contenant de l'agar en présence, ou non, de 500 ng/mL d'His-TRAIL pendant 15 jours avant d'ajouter du MTT pendant deux heures. Toutes les colonies colorées au MTT ont alors été quantifiées. **A.** Photographies représentatives de 3 expériences indépendantes. **B.** Moyennes \pm E.S.M., de 3 expériences indépendantes réalisées en double. **C-D.** Les HeLa SMS1 ont été transfectées avec un siRNA irrelevante (i) ou dirigé contre la SMS1 (s) pendant 24 heures. Les cellules ont alors été ensemencées dans du milieu contenant de l'agar en présence, ou non, d'His-TRAIL. **C.** Western Blot sur 15 μ g d'extraits protéiques de cellules HeLa transfectées, réensemencées 24 heures après la transfection et récupérées aux temps indiqués. Des anticorps anti-V5 et anti- β -actine ont été utilisés. **D.** Quantification du nombre de clones après 15 jours de croissance en agar mou. Les résultats sont exprimés en pourcentages du nombre de clones comptés pour la condition si irrelevante. Les données sont les moyennes \pm E.S.M., de 3 expériences indépendantes réalisées en double.

Nos résultats suggèrent donc que la SMS1 permet de réguler la formation de clones de cellules HeLa en agar en présence de TRAIL. Concernant les figures 31C et 31D, les effets obtenus avec ce protocole expérimental restent toutefois modérés, la diminution d'expression de la SMS1 induisant une baisse de 20% de la formation de clones en présence de TRAIL par rapport aux cellules contrôles. Ceci pourrait être lié au fait qu'il s'agit là d'une transfection transitoire, qui n'est peut être pas suffisamment efficace pour moduler fortement les taux des différents lipides régulés par l'activité SMS. Ainsi, il sera judicieux d'évaluer l'évolution des taux des sphingolipides modulés par une transfection transitoire de ce siRNA au cours du

temps. Il pourrait également être intéressant d'utiliser un shRNA permettant une diminution continue de l'expression de la SMS1 tout au long de l'expérience.

L'expression de la SMS1 inhibe la formation du DISC et l'activation des caspases dans les cellules HeLa.

Pour déterminer les mécanismes responsables de l'effet inhibiteur de SMS1 sur la signalisation de TRAIL, nous avons évalué la formation du DISC et l'activation des caspases dans les HeLa SMS1 et les cellules contrôles induites par TRAIL. Ces deux lignées cellulaires expriment DR4 et DR5 de façon identique et n'expriment pas les DcR1 et 2 (Figure 32A). Alors que la stimulation de cellules contrôle avec TRAIL induit le recrutement des DR4, DR5, de la caspase 8, de FLIP et le clivage de ce dernier, le recrutement de DR4, de la caspase 8 et de FLIP est inhibé dans les cellules HeLa SMS1 (Figure 32B). De plus, l'activation des caspases est inhibée dans les HeLa SMS1 (Figure 32C).

Par ailleurs, nous observons également l'apparition d'une forme de SMS1 de plus faible poids moléculaire, suggérant que cette enzyme peut également être clivée aussi au cours de la signalisation induite par TRAIL. Toutefois, cet événement ne semble pas être aussi intense que dans la signalisation de CD95 étant donné qu'une grande proportion de la forme pleine taille de la SMS1 est toujours observée à 8 heures de traitement (Figure 32C). Ces résultats indiquent donc que la SMS1 joue un rôle inhibiteur sur la cascade apoptotique dépendante de TRAILRs, *via*, au moins en partie, la modulation d'événement(s) précoce(s). Il serait intéressant d'évaluer la proportion de TRAILRs liés à TRAIL ainsi que le clustering des DR dans les différentes lignées afin de mieux comprendre le mécanisme de modulation de la formation du DISC par la SMS1.

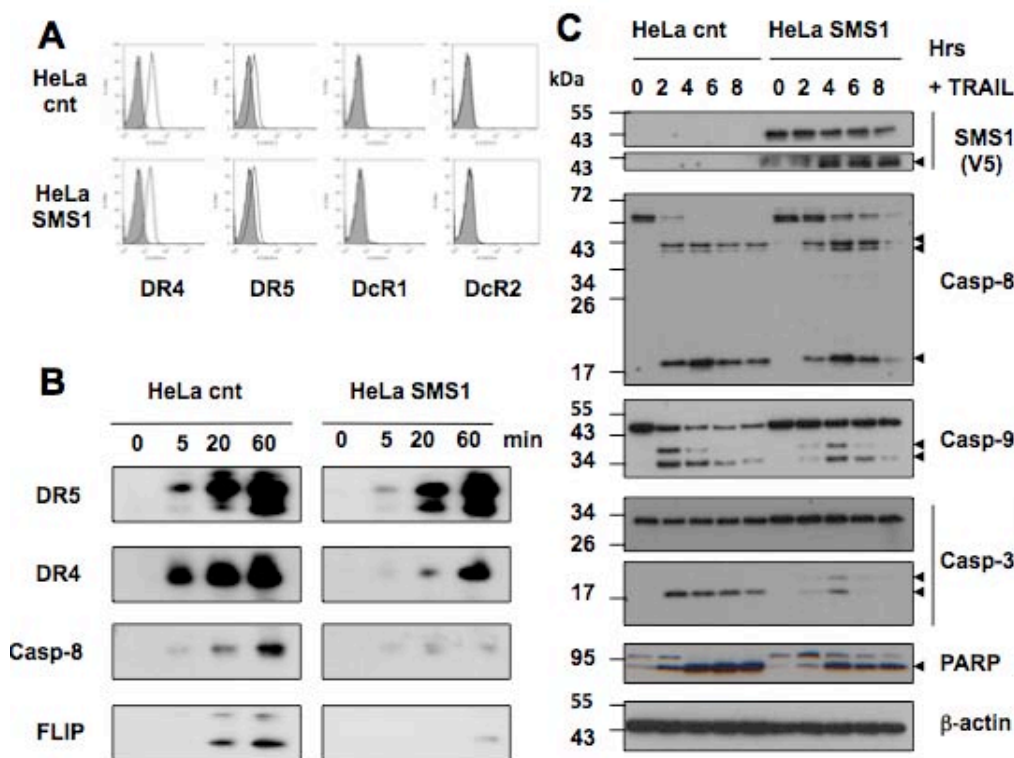


Figure 32 : La formation du DISC et la cascade d'activation des caspases sont inhibées dans les cellules HeLa SMS1. A. L'expression des DR4, DR5, DcR1 et DcR2 à la surface cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux dans les cellules HeLa SMS1 et cnt. Les pics grisés correspondent au contrôle isotypique et les pics blancs au signal obtenu avec les anticorps spécifiques de chaque récepteur. **B.** Les cellules HeLa cnt et SMS1 ont été stimulées avec du Flag-TRAIL/M2 pendant les temps indiqués. Les cellules ont été lysées et le DISC a été immunoprécipité et analysé par western blot. Les données sont représentatives de deux expériences indépendantes. La partie inférieure du western blot réalisé avec l'anti-V5 correspond à une exposition plus longue. **C.** Les cellules HeLa cnt et SMS1 sont incubées en présence de 100 ng/mL de TRAIL pendant les temps indiqués. Un western blot a été réalisé sur 20 µg d'extraits protéiques avec les anticorps indiqués.

La perte de viabilité induite par la chimiothérapie est inhibée par l'expression de la SMS1 dans les cellules HeLa.

Certaines molécules de chimiothérapie, dont le 5FU, l'étoposide et le cisplatine, permettent de sensibiliser des cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose induite par TRAIL (Morizot *et al.*, 2010). Nous avons dans un premier temps cherché à évaluer la sensibilité des cellules HeLa, surexprimant ou non, la SMS1 à l'apoptose induite par ces molécules. Puis, nous avons également évalué si un pré-traitement par l'une d'entre elles, le 5FU, pouvait avoir un effet sensibilisateur vis-à-vis de l'apoptose induite par TRAIL. Les cellules HeLa SMS1 résistent significativement à la mort induite par le 5FU, l'étoposide et le cisplatine (Figures 33A, B et C).

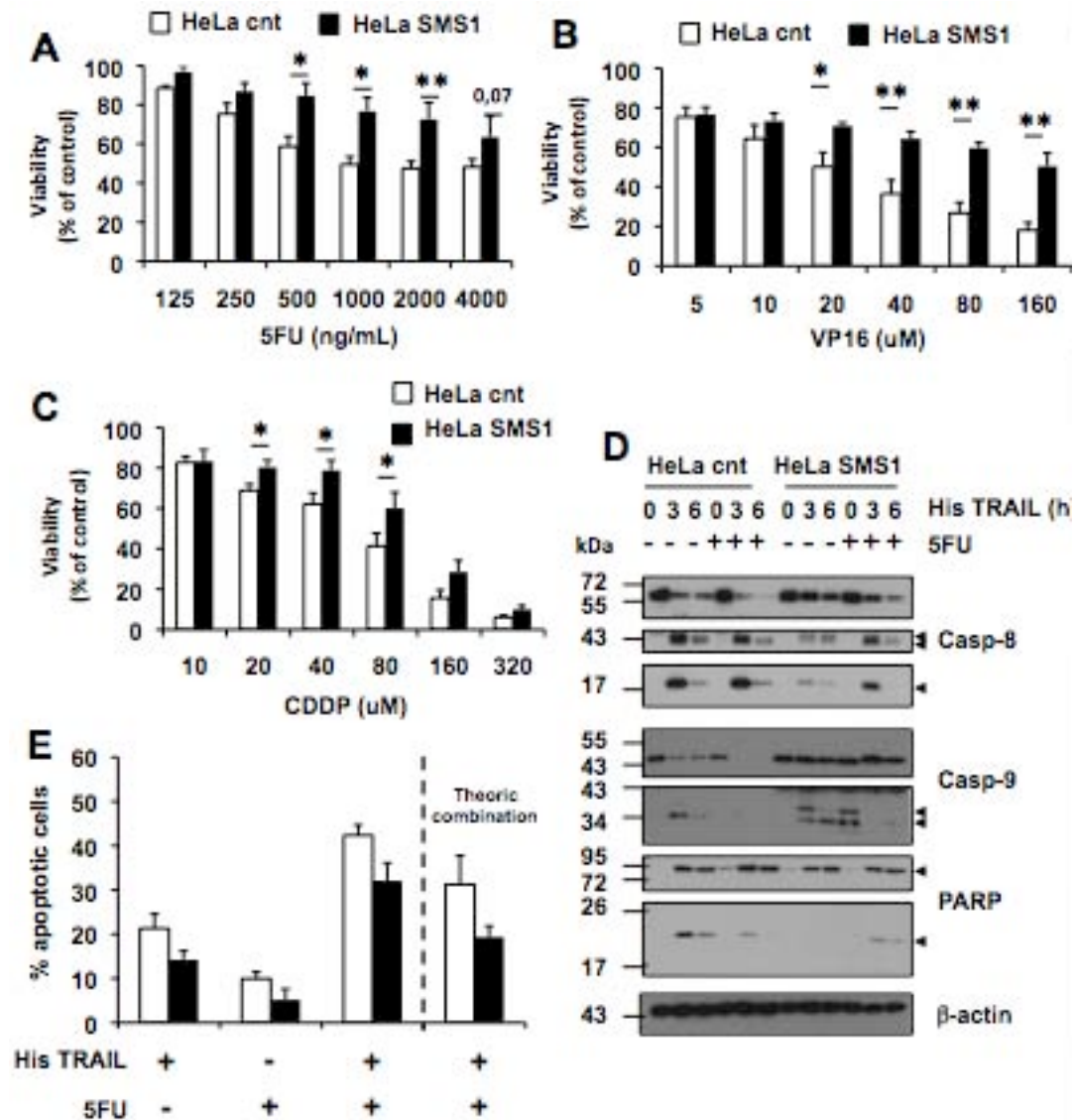


Figure 33 : La SMS1 inhibe la perte de viabilité induite par plusieurs molécules de chimiothérapie.

A. Les cellules HeLa cnt et HeLa SMS1 ont été incubées en présence de 5FU (1 µg/mL ou les doses indiquées) pendant 72 heures. **B-C.** Les cellules HeLa cnt et HeLa SMS1 ont été incubées avec de l'étoposide (VP16) ou du cisplatine (CDDP) aux doses indiquées pendant 3 heures en l'absence de SVF puis avec du milieu complet pendant 48 heures. **A-C.** La viabilité cellulaire a été évaluée par test MTT. Les données sont des moyennes ± E.S.M. de 4 expériences indépendantes. **D-E.** Après le pré-traitement au 5FU, les cellules ont été incubées en présence, ou non, de 500 ng/mL d'His TRAIL pendant 8 heures (ou les temps indiqués). **D.** Western blot sur 20 µg d'extraits protéiques avec les anticorps indiqués. **E.** La proportion de cellules à noyaux apoptotiques a été évaluée par microscopie et l'apoptose spécifique (% de cellules apoptotiques dans la condition observée - % de cellules apoptotiques en condition « non traitée ») a été calculée. Le % « théorique » de cellules apoptotiques a été calculé pour la condition « 5FU+ His - TRAIL » par addition des % de cellules en condition « 5FU » et « His-TRAIL » et les résultats sont indiqués (theoric combination). Les données sont des moyennes ± E.S.M. de 3 expériences indépendantes.

Les cellules ont ensuite été prétraitées au 5 FU avant l'ajout de TRAIL. Ce pré-traitement, qui exerce peu d'effet cytotoxique en lui-même, permet une exacerbation du clivage de la caspase-8 et de la caspase 9 induit par TRAIL dans les cellules contrôles et, dans une moindre

mesure, dans les HeLa SMS1 (Figure 33D). Par ailleurs, ce pré-traitement induit une augmentation de l'apoptose spécifique induite par TRAIL (Figure 33E). L'effet chimiosensibilisateur semble au minimum additionnel, voire synergique. Globalement, ces données suggèrent donc que la SMS1 inhibe partiellement la perte de viabilité induite par différentes molécules de chimiothérapie et que les cellules HeLa, surexprimant, ou non, la SMS1 peuvent être sensibilisées vis-à-vis de TRAIL par un pré-traitement au 5FU.

La résistance des cellules surexprimant la SMS1 à TRAIL aux molécules de chimiothérapie est-elle liée à une inhibition de l'accumulation de céramide ?

Etant donné que la SMS1 permet de métaboliser le céramide en SM, nous évaluons actuellement si la résistance des HeLa SMS1 vis-à-vis de TRAIL et/ou des différentes molécules de chimiothérapie testées au cours de cette étude pourrait être liée à une limitation de l'accumulation de céramide dans ces cellules. De façon intéressante, des résultats préliminaires indiquent que le 5FU et l'étoposide induisent une accumulation de céramide plus limitée dans les cellules surexprimant la SMS1 que dans les cellules contrôles (Figures 34A et 34B). Par ailleurs, l'incubation de cellules HeLa avec du C16-céramide permet d'induire un relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol et l'apparition de noyaux à morphologie apoptotique, deux événements inhibés par la surexpression de la SMS1 (Figure 34C), ce qui laisse supposer que la SMS1 pourrait inhiber l'action pro-apoptotique du céramide, notamment en limitant l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose. L'incubation des cellules HeLa SMS1 avec de la sphingomélinase bactérienne exogène permet une accumulation de céramide endogène importante (Figure 34D) par hydrolyse de la SM située à la surface cellulaire (Figure 34E). Cette élévation de céramide ne peut pas être contrecarrée par la surexpression de la SMS1, enzyme Golgienne. L'incubation des cellules avec de la SMase exogène induit une légère augmentation, non significative, du nombre de cellules apoptotiques (Figure 34F). De façon intéressante, le pré-traitement des cellules HeLa SMS1 avec de la SMase bactérienne exogène permet de les sensibiliser de façon significative à l'apoptose induite par TRAIL (Figure 34F). Nous évaluons actuellement le taux de céramide dans les cellules HeLa cnt et SMS1 à différents temps de traitement par TRAIL afin de déterminer si le céramide naturellement accumulé au cours de la signalisation de TRAIL peut également être métabolisé par la SMS1.

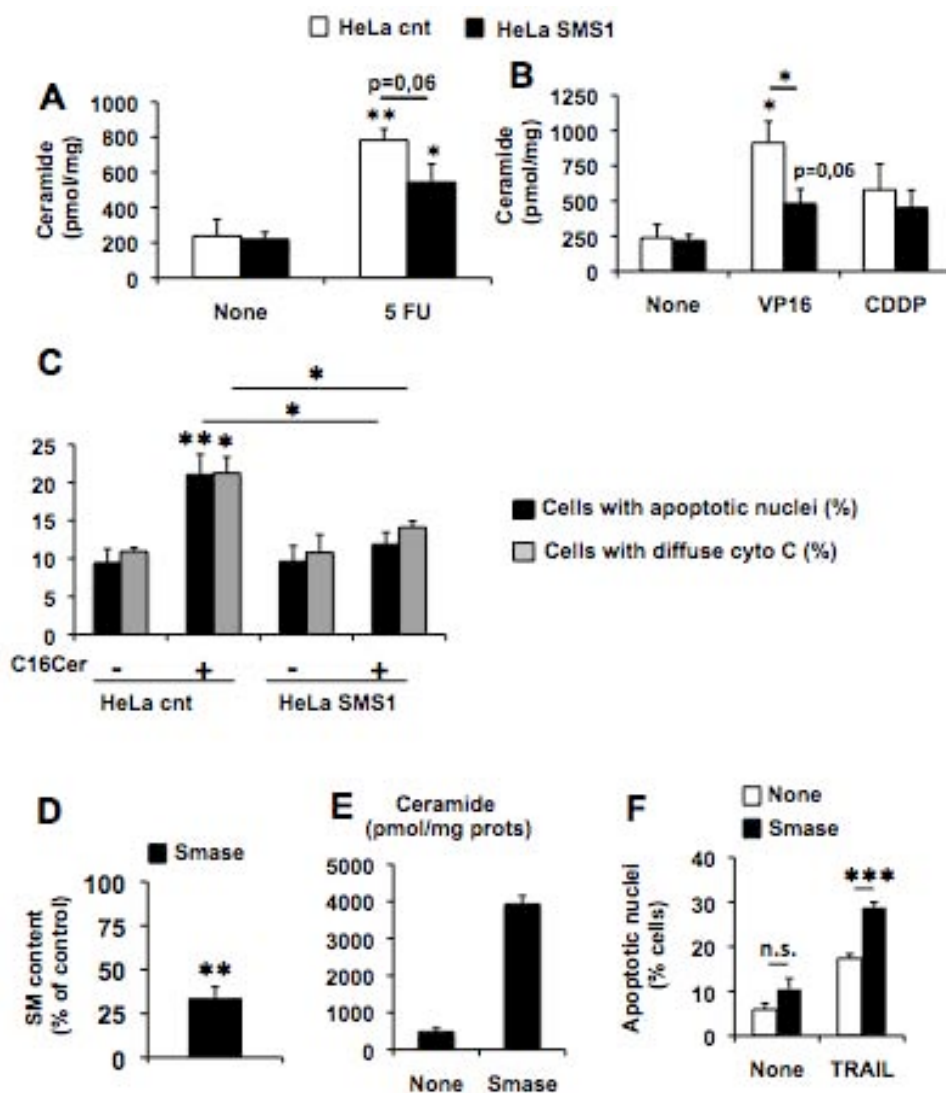


Figure 34 : La surexpression de la SMS1 inhibe l'élévation de céramide induite par le 5FU et le VP16 et l'apoptose induite par le C16 céramide. **A et B.** Les cellules HeLa cnt et SMS1 ont été incubées en présence de 5FU (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pendant 72 heures ou avec de l'étoposide (VP16) ou du cisplatine (CDDP) aux doses indiquées pendant 3 heures en l'absence de SVF puis avec du milieu complet pendant 48 heures. Le taux de céramide a été déterminé par test à la DAG kinase. **C.** Les HeLa SMS1 et cnt ont été incubées en présence, ou non, de 10 μM de C16-céramide pendant 8h. Le pourcentage de cellules présentant un relargage de cytochrome c ou des noyaux à morphologie apoptotique a été évalué par microscopie. **D-F.** Les cellules surexprimant la SMS1 ont été incubées en présence de 0,1 mU/mL de SMase bactérienne pendant une demi-heure. **D.** Le contenu en SM a été déterminé par marquage à la choline tritiée et exprimé en % des cellules non traitées. Les données sont des moyennes \pm E.S.M., $n=3$. **E.** Le contenu en céramide a été évalué par dosage à la DAG kinase. Les données sont des moyennes \pm E.S.M., $n=3$. **F.** Les cellules HeLa SMS1, pré-incubées, ou non, en présence de sphingomyélinase bactérienne ont été incubées pendant 8 heures en présence, ou non, de 5 ng/mL de TRAIL. Le pourcentage de cellules présentant un noyau à morphologie apoptotique a été évalué par microscopie. Les données sont des moyennes \pm E.S.M., $n=3$.

Nous avons également évalué la sensibilité des cellules SW480, une autre lignée de cancer colique, surexprimant ou non, la SMS1 de façon stable. De façon intéressante, l'augmentation de l'expression (Figure 35A), et de l'activité (Figure 35B), de la SMS1 dans ces cellules de

type I ne leur confère pas d'avantage de survie (Figure 35C). Nous évaluons actuellement l'impact de la diminution d'expression de la SMS1 dans ces cellules. Il serait par ailleurs intéressant d'évaluer si cette absence d'effet de la surexpression de la SMS1 sur la réponse à TRAIL est également retrouvé dans d'autres cellules de type I.

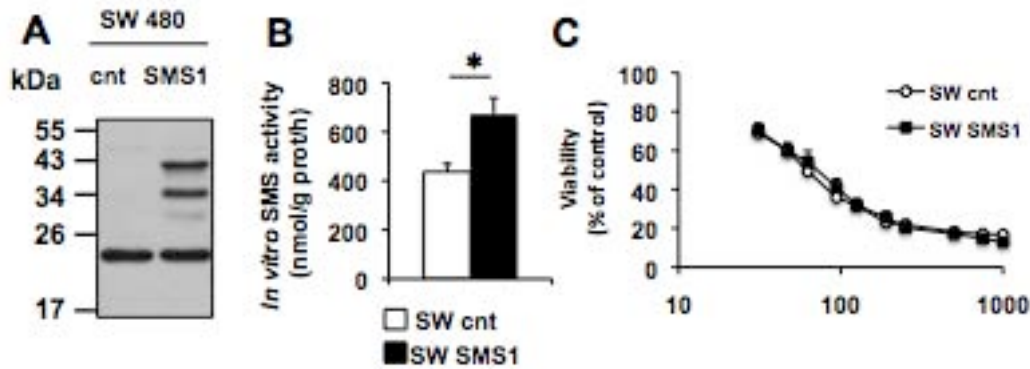


Figure 35 : La surexpression de la SMS1 ne confère pas de résistance vis-à-vis de TRAIL dans les cellules SW480. **A.** Western blot sur 20 μ g d'extraits protéiques de cellules SW480 surexprimant (SMS1), ou non (cnt), la SMS1. **B.** L'activité spécifique de synthèse de SM a été mesurée sur 100 μ g d'extraits protéiques de cellules SW cnt ou SMS1. Les données sont des moyennes \pm E.S.M. de 4 expériences indépendantes. **C.** La viabilité cellulaire a été déterminée par test MTT. Les résultats sont exprimés en % de cellules non traitées. Les données sont exprimées en moyennes \pm E.S.M. de 3 à 7 expériences.

IV. Article 3 : Rôle de la caspase 9 dans l'apoptose induite par le céramide dans les cellules leucémiques T Jurkat.

IV.1. Contexte de l'article 3 :

Plusieurs études indiquent que le céramide pourrait jouer un rôle en faveur de l'apoptose cellulaire, toutefois, le ou les mécanismes exacts(s) de ce rôle pro-apoptotique sont peu compris. Plusieurs études soulignent que le céramide, produit en réponse à des stress cellulaires, tels que la liaison des ligands de mort sur les DR, ou l'addition de céramide exogène sur les cellules, pourrait activer une voie mitochondriale de l'apoptose. La mort induite par l'ajout de céramide exogène ou d'analogues de céramide, ainsi que la mort cellulaire en réponse à certains stress qui favorisent l'accumulation de céramide intracellulaire s'accompagne fréquemment d'une perméabilisation de la membrane mitochondriale (cf. chapitre II.3.2.1 de la revue générale) et d'un relargage de facteurs mitochondriaux. L'induction de mort dépendante du céramide peut ainsi être régulée en modulant l'expression de membres de la famille de Bcl-2. Ainsi, il a été mis en évidence au sein de l'équipe que la surexpression de Bcl-XL permet d'inhiber significativement la toxicité induite par deux analogues de céramide (Granot *et al.*, 2006). De plus, des cellules carcinomateuses déficientes en Bax résistent à l'apoptose induite par le C2-céramide (von Haefen *et al.*, 2002). En outre, l'expression d'un dominant négatif de la caspase 9 inhibe la toxicité induite par le C2-céramide dans des cellules neuronales (Movsesyan *et al.*, 2002). Par ailleurs, le céramide pourrait également activer la voie mitochondriale en activant des cibles protéiques régulatrices de protéines de cette voie. Enfin, le céramide pourrait également agir de façon directe au niveau de la mitochondrie. Il a ainsi été mis en évidence que le céramide pourrait former des canaux au niveau de la membrane mitochondriale et favoriser la perméabilisation (Siskind, 2005). Par ailleurs, la formation de radeaux lipidiques riches en céramide au niveau mitochondrial pourrait également moduler sa perméabilisation.

Nous avons cherché à déterminer l'implication de la caspase 9 dans la mort cellulaire induite par des céramides exogènes et au cours de la mort induite par CD95L, qui, comme décrit précédemment, s'accompagne physiologiquement d'une accumulation de céramide. Pour cela, nous avons d'une part, évalué l'effet de différents céramides exogènes sur des cellules Jurkat déficientes en caspase 9, qui résistent de façon partielle à l'apoptose induite par CD95L. D'autre part, nous avons utilisé des cellules Jurkat exprimant de façon stable un

siRNA dirigé contre la SMS1, qui présentent une activité de synthèse de sphingomyéline diminuée et sont plus sensibles à l'apoptose induite par CD95L que des cellules contrôles (cf. article 2).

Ordering of ceramide formation and caspase-9 activation in CD95L-induced Jurkat leukemia T cell apoptosis.

Running title: caspase-9 in ceramide signaling.

Elodie Lafont^{1,2}, Romain Dupont¹, Nathalie Andrieu-Abadie¹, Toshiro Okazaki³, Klaus Schulze-Osthoff⁴, Thierry Levade¹, Hervé Benoist^{1,2} and Bruno Ségui^{1,2}

¹ INSERM UMR1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Equipe 4, BP84225, 31432 Toulouse cedex 4 France.

² Université Paul Sabatier (Toulouse III), Faculté des sciences pharmaceutiques, service de biologie cellulaire, hématologie et immunologie, 35 chemin des maraîchers, 31062, Toulouse, France.

³ Department of Medicine, Kanazawa Medical University, Clinical Research Build. 1-1 Daikaku, Uchinada, Ishikawa 920-0293.

⁴ Interfaculty Institute for Biochemistry, University of Tübingen, Hoppe-Seyler-Str. 4, 72076 Tübingen, Germany.

Corresponding author: Bruno Ségui; (33)5.61.32.35.31; Fax (33)5.61.32.20.84;

E-mail: bruno.segui@inserm.fr

Keywords: Sphingolipid, Sphingomyelin synthase 1, Death receptor, mitochondria, cytochrome c

Abstract

Ceramide, a biologically active sphingolipid in cell death signaling, is accumulated upon CD95L treatment, concomitantly to apoptosis induction in Jurkat leukemia T cells. Herein, we show that ceramide did not increase in caspase-8 and -10-doubly deficient Jurkat cells in response to CD95L, indicating that apical caspases are essential for CD95L-triggered ceramide formation. Jurkat cells are typically defined as type 2 cells, which require the activation of the mitochondrial pathway for efficient apoptosis induction in response to CD95L. Caspase-9-deficient Jurkat cells significantly resisted CD95L-induced apoptosis, despite ceramide accumulation. Knock-down of sphingomyelin synthase 1, which metabolizes ceramide to sphingomyelin, enhanced (i) CD95L-triggered ceramide production, (ii) cytochrome c release from the mitochondria and (iii) caspase-9 activation. Exogenous ceramide-induced caspase-3 activation and apoptosis were impaired in caspase-9-deficient Jurkat cells. Conversely, caspase-9 re-expression in caspase-9-deficient Jurkat cells restored caspase-3 activation and apoptosis upon exogenous ceramide treatment. Collectively, our data provide genetic evidence that CD95L-triggered endogenous ceramide increase in Jurkat leukemia T cells (i) is not a mere consequence of cell death and occurs mainly in a caspase-9-independent manner, (ii) is likely involved in the pro-apoptotic mitochondrial pathway leading to caspase-9 activation.

Abbreviations: Bcl-2/xL/x(s), B-cell lymphoma-2/xL/x(s); Bid, Bcl-2 interacting domain; DISC, death-inducing signaling complex; GlcCer, Glucosylceramide; GCS, Glucosylceramide synthase; SM, sphingomyelin; SMS, sphingomyelin synthase.

Introduction

Apoptosis, or programmed cell death, is an essential physiological process, regulating cell homeostasis and immune responses. CD95L, a member of the TNF superfamily, is produced by T lymphocytes and Natural Killer cells and induces apoptosis of autoreactive T lymphocytes as well as tumor and damaged cells.¹ CD95 triggers two main pro-apoptotic pathways leading to the activation of proteases of the caspase family.² Both pathways are initiated by the death-inducing signaling complex (DISC) formation, consisting in the successive recruitment of the FADD adapter protein and initiator caspases-8 and -10.^{3, 4} DISC formation allows the autocatalytic cleavage and activation of caspases-8 and -10, which in turn can directly cleave and activate effector caspases-3 and -7.⁵⁻⁸ Effector caspases cleave and inactivate essential proteins for cell survival, leading to cell dismantling. This first pathway is amplified by the mitochondrial pathway, which can also be initiated by caspases-8 and -10. Indeed, both caspase-8 and -10 cleave Bid (Bcl-2 interacting domain) to truncated Bid (tBid),^{9, 10} which translocates to the mitochondria to increase the permeability of the outer mitochondria membrane, allowing cytochrome c release from the mitochondria to the cytosol.¹¹ Cytochrome c interacts with the adapter protein APAF-1 and the initiator pro-caspase-9 to form the apoptosome, which enables the autocatalytic activation of caspase-9.¹² Once activated, caspase-9 cleaves and activates effector caspases, amplifying the programmed cell death. The apoptotic signaling pathway initiated by CD95 likely depends on the cell type.² In type 1 cells, DISC is efficiently formed and the mitochondrial pathway is not required for apoptosis induction. In type 2 cells, including the Jurkat T leukemia cell line, the DISC is weakly formed and the mitochondrial pathway is a major contributor to apoptosis signaling.²

Ceramide, a putative biologically active sphingolipid, is produced in response to many pro-apoptotic stimuli, including CD95L.^{13, 14} Ceramide derived from the hydrolysis of sphingomyelin by acid sphingomyelinase has been shown to facilitate CD95 capping and DISC formation.^{15, 16} However, the role of acid sphingomyelinase in CD95 signaling remains a matter of debate.^{17, 18} We and others have shown that ceramide accumulates concomitantly to apoptosis induction in type 2 Jurkat leukemia T cells in response to CD95 stimulation.¹⁹⁻²² This ceramide increase was abolished by treating the cells with the broad-spectrum caspase inhibitor zVAD-fmk.²³ In addition, loss of caspase-8 in Jurkat T cells impaired anti-CD95-induced ceramide formation,¹⁹ further indicating that CD95-triggered ceramide increase is a caspase-dependent event.

Ceramide likely triggers the mitochondrial pathway, increasing cytochrome c and AIF release from the mitochondria to the cytosol.^{21, 24} The toxicity of exogenous ceramide analogues, including the release of cytochrome c from the mitochondria induced by C2-ceramide, was impaired in cancer cells over-expressing Bcl-2 or Bcl-xL.¹³ C2-ceramide-triggered apoptosis in neuronal cells was impaired by pharmacological inhibition of caspase-9 or by expressing a dominant-negative form of caspase-9.²⁵ The ability of ceramide to trigger cytochrome c release may depend on the modulation of different signaling pathways, such as the inhibition of the phosphoinositide-3 kinase (PI3K) and Akt/PKB, leading to the decreased phosphorylation and subsequent activation of Bad, a proapoptotic member of the Bcl-2 family.²⁶ C2-ceramide promoted the activation of protein phosphatase 2A (PP2A), which dephosphorylates and inactivates Bcl-2.²⁷ Cell-permeable ceramide also triggered protein phosphatase 1 (PP1)-dependent (i) dephosphorylation of SR proteins, a family of serine/arginine domain containing proteins that modulate mRNA

splicing,²⁸ and (ii) alternative splicing of caspase-9 and Bcl-xL mRNA, enabling the expression of pro-apoptotic caspase-9 and Bcl-x(s).²⁹ Moreover, functional and structural alterations of mitochondria have been described in response to C2-ceramide.³⁰ C2-, C6- as well as the natural C16-ceramide induced cytochrome c release from isolated mitochondria,³¹ most likely through formation of ceramide channels³² and/or ceramide-rich macrodomains in mitochondrial membranes.³³ Moreover, positively charged ceramide induced permeability alterations of the inner and outer mitochondrial membranes.³⁴

A number of studies, however, indicate that ceramide is not a potent activator of the pro-apoptotic mitochondrial pathway. As a matter of fact, in some reports, ceramide alone did not trigger cytochrome c release.^{35, 36} Long-chain ceramide was even reported to inhibit the mitochondrial permeability transition pore opening and cytochrome c release from isolated mitochondria.³⁷ Pharmacological inhibition of caspase-9 did not impair exogenous ceramide-induced cell death in K562 chronic leukemia cells.³⁸ Moreover, exogenous ceramide also triggered a non-apoptotic form of cell death, including cell death associated with necrosis, autophagy, endoplasmic reticulum stress and Golgi dismantling.¹³ Therefore, ceramide-induced cell death is not always associated with classical apoptotic features, and the mitochondrial pathway does not seem to be essential for ceramide-induced cell death. In addition, whether endogenous ceramide increase in stress-induced apoptosis is an epiphenomenon or a causal event in cell signaling, remains an open issue.¹³

Herein, the role of caspase-9 in CD95L and ceramide-induced cell death was investigated by comparing the response of caspase-9-deficient and –proficient Jurkat cells to both stimuli. For the first time, we provide genetic evidence that in Jurkat cells

(i) CD95L-induced endogenous ceramide increase occurs mainly in a caspase-9-independent manner, and (ii) ceramide triggers caspase-9-dependent apoptosis.

Materials and Methods

Reagents- Final dilutions and the source of reagents were as follows: monoclonal anti-caspase-8 (clone C15) was purchased from Alexis Biochemicals (Villeurbanne, France) and used at 1/5000 dilution. Polyclonal anti-caspase-9, polyclonal anti-caspase-3, polyclonal anti-PARP and polyclonal anti- β -actin were purchased from Cell Signaling Technology (Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and used at 1/1000 dilution. Monoclonal anti-cytochrome c (clone 6H2.B4) was purchased from BD Pharmingen and used at 1/500 dilution. Anti-mouse IgGs conjugated with Alexa 488 was purchased from Molecular Probes Inc.-Invitrogen and used at 1/500 dilution. C2-ceramide and C16-ceramide were purchased from Biomol (Villeurbanne, France) and diluted in ethanol or dodecane/ethanol (2:98, v/v), respectively. Human recombinant CD95L was obtained from Abcys (Paris, France). Alternatively, mouse CD95L produced in the supernatant of Neuro-2A cells stably transfected with a plasmid encoding CD95L³⁹ was used. Similar data were obtained using mouse or human CD95L.

Cell lines- Parental Jurkat T leukemia cells A3 (WT) and derived cell lines deficient for caspase-8 (I9-2)⁴⁰ were kindly provided by Dr. J. Blenis (Boston, MA). I9-2d (Δ C8) and I9-2e cells (Δ C8/C10) were isolated by limiting dilution experiments from I9-2 cells as previously described.^{10, 41} Caspase-9-deficient Jurkat cells (clone JMR/ Δ C9) and caspase-9-reconstituted JMR cells (7E7/ Δ C9+) were previously characterized.⁴² Jurkat cells were stably transduced by a retroviral vector encoding either a scrambled 5'(ATTGAAAAAGACACGCGCC)3' (control cells) or human SMS1 siRNA 5'(GCCCAACTGCGAAGAATAA)3' (SMS1 KD cells).⁴³ Cells were cultured in RPMI 1640 medium containing Glutamax and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS).

Jurkat cells were authenticated through cell morphology monitoring and analysis of cell surface expression of the CD3 and CD95 by flow cytometry. All cell lines were passaged less than six months after which time cultures were reinitiated from early passage frozen stocks. Cells were verified every three months by PCR to be mycoplasma-free.

Flow cytometry analyses- Phosphatidylserine (PS) externalization was evaluated by labeling cells with Annexin V-FITC (250 ng/ml) and propidium iodide (12.5 µg/ml) (Immunotech, Marseille, France) for 10 min at 4°C. Analyses were performed on a FACScan cytometer (Becton Dickinson).¹⁰

MTT assay- Cell viability was evaluated by the tetrazolium-based MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay. Cells were seeded in flat-bottomed 96-well plates (10⁶ cells/mL, 100 µL/well) for the indicated times at 37°C. MTT (0.5 mg/mL; Sigma) was added during the last two hours. Formazan crystals were solubilized overnight at 37°C by adding 100 µL of solubilization buffer (0.01 N HCl, 10% SDS) and quantified spectrophotometrically using an ELISA reader (λ=560 nm).

Protein extraction and Western blot analyses- For total protein extraction, cells were lysed for 30 min on ice in a buffer containing 10 mM HEPES (pH 7.4), 42 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5% CHAPS, 1 mM PMSF and 2 mg/mL leupeptin. Samples were briefly sonicated and centrifuged at 3,500 x g at 4°C for 10 min. Supernatants were collected and protein content was determined by the Bradford method (Biorad). For Western blot analyses, equal amounts of proteins were separated on 12.5% SDS-PAGE.

Determination of in situ SMS and GCS activities- 1×10^6 Jurkat cells were incubated in 1 mL RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum (FCS) and 2.5 μ M C₆-NBD-ceramide (Sigma) solubilized in ethanol. After incubation at 37°C for 2 hours, the reaction was stopped and lipids were extracted from the cells plus the medium by adding 5 mL of chloroform/methanol (2:1, v/v). After centrifugation (1000 x g, 10 min), the lower phases were dried under nitrogen and resolved by analytical thin layer chromatography (TLC) developed in chloroform/methanol/30% ammonia (70:30:5, by vol.). C₆-NBD-ceramide, C₆-NBD-GlcCer and C₆-NBD-SM were eluted from the silica and quantified spectrofluorometrically ($\lambda_{\text{ex}}=470$ nm and $\lambda_{\text{em}}=530$ nm).²²

Ceramide mass measurement- Lipids were extracted as described above. Ceramide mass was determined using *E. coli* membranes as a source of DAG kinase (a kind gift of Drs. D. Perry and Y.A. Hannun; Charleston, NC). Radioactive ceramide-1-phosphate was isolated by TLC using chloroform/acetone/methanol/acetic acid/water (50:20:15:10:5, by vol.) and then scraped before counting radioactivity by liquid scintillation.

Morphological and cytochrome c release analyses- Jurkat cells were co-incubated with propidium iodide (2 μ g/ml; Sigma) and Syto 13 (2.5 μ M; Molecular Probes) for 15 min at 37 °C and analyzed under a Leica fluorescence-equipped microscope. For nuclear fragmentation and cytochrome c release determination, Jurkat cells were grown on poly-lysine slides (VWR). Cells were further incubated in the presence or absence of CD95L as indicated, fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized with PBS containing 0.1% Triton X-100 for 15 min, labeled with anti-cytochrome c diluted in PBS for 1 hour followed by several washes in PBS and a

one-hour incubation with anti-mouse IgGs conjugated with Alexa 488. Cells were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to visualize the nuclei. Pro-long Gold anti-fade reagent (Invitrogen) was used to mount coverslips on the slides and cells were examined under a Leica fluorescence-equipped microscope using a x40-oil objective. At least 300 cells were examined and the percentage of cells exhibiting apoptotic nuclei and/or diffuse cytochrome c staining was determined.

Statistical analyses- Results are expressed as means \pm s.e.m. of at least three independent determinations per experiment. Mean values were compared using the Student's *t*-test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n.s. : not significant).

Results

Loss of caspase-9 impairs apoptosis but not ceramide production in response to CD95L.

In agreement with previous studies that employed an agonistic anti-CD95 antibody,^{19-21, 23} we recently reported that CD95L triggered caspase-dependent ceramide accumulation, concomitantly to apoptosis induction in Jurkat leukemia T cells.²² To evaluate the role of initiator caspases in CD95L-triggered ceramide increase, we analyzed the response to CD95L of caspase-8 and -10-doubly-deficient (clone I9-2e) and caspase-9-deficient (clone JMR) Jurkat cells (Figure 1A). CD95L-induced ceramide generation and cell death were abolished in caspase-8 and -10-doubly-deficient Jurkat cells, further highlighting the critical role of apical initiator caspases in CD95 signaling (Figs. 1B and C). In good agreement with a previous study,⁴² caspase-9-deficient Jurkat cells significantly resisted 50 ng/mL CD95L, as evaluated by cell viability measurement (Fig. 1B). However, caspase-9-deficient cells were only partially resistant to 500 ng/mL CD95L (Fig. 1C), indicating that CD95 triggers the activation of both caspase-9-dependent and -independent cell death pathways. Of a particular interest was the finding that CD95L-triggered ceramide accumulation still occurred in caspase-9-deficient Jurkat cells at both CD95L concentrations (Figs. 1B and C). Thus, ceramide accumulation in CD95 signaling is mainly a caspase-9-independent phenomenon.

SMS1 knockdown enhances CD95L-triggered ceramide increase and the apoptotic mitochondrial pathway activation.

We next evaluated the possibility that endogenous ceramide increase might be involved in CD95L-induced activation of the mitochondrial pathway in Jurkat leukemia T cells. To this end, we took advantage of our recent findings, showing that

knockdown of sphingomyelin synthase 1 (SMS1) enhances ceramide increase in response to CD95L.²² In agreement with previous reports,^{22, 43} SMS1 knockdown was associated with a significant reduction of total SMS activity, whereas glucosylceramide synthase (GCS) activity remained unaffected (Figure 2A). CD95L-triggered ceramide increase was enhanced in SMS1 knockdown cells (Figure 2B). Interestingly, CD95L-induced cytochrome c release was enhanced in SMS1 knockdown cells (Figure 2C), and this phenomenon was associated with an increased apoptosis as evaluated by nuclear fragmentation (Figure 2C) and caspase cascade activation, including caspase-9 (Figure 2D). The latter data not only confirms our previous study,²² but also suggests that endogenous ceramide increase is likely involved in cytochrome c release from the mitochondria in CD95 signaling, leading to caspase-9 activation.

Loss of caspase-9 impairs exogenous ceramide-triggered apoptosis.

Since caspase-9-deficient Jurkat cells significantly resisted CD95L despite substantial ceramide accumulation (Figure 1) and because caspase-9 activation was enhanced in SMS1 knockdown Jurkat cells (Figure 2), we hypothesized that caspase-9 is important for ceramide-triggered apoptosis. To evaluate this tenet, wild-type and caspase-9-deficient Jurkat cells were pre-incubated in the presence of exogenous cell-permeant C2-ceramide for 16 hours and cell viability was evaluated. Caspase-9-deficient Jurkat cells resisted C2-ceramide-induced loss of cell viability (Figures 3A and B). In sharp contrast, caspase-8-deficient as well as caspase-8 and -10-doubly deficient Jurkat cells were as sensitive to C2-ceramide as their wild-type counterparts (Figure 3A). To further evaluate the role of caspase-9 in ceramide-induced cell death, caspase processing was monitored by Western blot analysis. Whereas C2-ceramide triggered caspase-9 and -3 activation in wild-type Jurkat cells,

caspase-3 was not activated in caspase-9-deficient Jurkat cells (Figure 3C). Accordingly, morphological analysis indicated that 10 μ M C2-ceramide triggered classical apoptosis (i.e., cells exhibiting nuclear condensation and/or fragmentation) in wild-type but not in caspase-9-deficient Jurkat cells (Figures 3D and 4). Of note, the resistance towards C2-ceramide observed in caspase-9-deficient Jurkat cells was not associated with a defect of C2-ceramide uptake, as evaluated by the DAG kinase assay (which showed the presence of C2-ceramide in the cell extracts; data not shown). Noteworthy was the finding that C2-ceramide promoted cytochrome c release equally well in wild-type and caspase-9-deficient cells, indicating that the increase in C2-ceramide-induced mitochondrial membrane permeability increase was not a mere consequence of cell death (Figures 4B and C).

To further evaluate the role of caspase-9 in ceramide signaling, we analyzed the response to C2-ceramide of caspase-9-deficient cells, which had been stably transfected with a plasmid encoding human caspase-9 (Figure 5). As expected, the transfectants stably expressed caspase-9, as evaluated by Western blot analysis, and were significantly more sensitive to C2-ceramide than their caspase-9-deficient counterparts (Figure 5A). Accordingly, not only ectopic caspase-9, but also endogenous caspase-3, were activated upon C2-ceramide treatment in genetically corrected cells (Figure 5B). Finally, corrected cells displayed apoptotic features (i.e., nuclear condensation and/or fragmentation) in response to exogenous ceramide (Figure 5C).

Altogether, our data indicate that caspase-9 plays an important role in C2-ceramide-induced apoptosis, whereas apical caspases-8 and -10 are likely dispensable.

Caspase-9 deficiency impairs natural ceramide-induced apoptosis in Jurkat cells.

Mass spectrometry analysis indicated that C16:0 ceramide is the predominant ceramide species in Jurkat cells.²² Moreover, CD95L treatment was accompanied by a significant increase in all ceramide species, C16:0 ceramide being the most accumulated.²² Thus, we sought to evaluate the role of caspase-9 in ceramide-induced cell death, by incubating the cells in the presence of natural C16-ceramide. To this end, C16-ceramide was solubilized in dodecane and ethanol (0.004% and 0.196%, final concentrations) to be efficiently delivered to the cells.⁴⁴ Under our experimental conditions, C16-ceramide potently activated caspase-9 and -3 (Figure 6A) and increased the proportion of cells exhibiting apoptotic nuclei (i.e., condensed and/or fragmented nuclei) (Figure 6B). Of particular interest, C16-ceramide induced cell death, as evaluated by flow cytometry, in wild-type but not in caspase-9-deficient Jurkat cells. As a matter of fact, C16-ceramide increased the proportion of cells exhibiting phosphatidylserine externalisation at the cell surface (i.e., annexin-V positive and propidium iodide negative cells), a hallmark of apoptosis, in a dose-dependent manner in wild-type but not in caspase-9-deficient Jurkat cells (Figure 6C). In addition, the proportion of cells, which displayed an increased plasma membrane permeability (propidium iodide-positive cells) was augmented in wild-type and, albeit to a lesser extent, in caspase-9-deficient Jurkat cells (Figure 6C).

Thus, our data indicate that caspase-9 plays a critical role in natural C16-ceramide-induced cell death of Jurkat leukemia T cells.

Discussion

This study provides genetic evidence that (i) elevation of endogenous ceramide levels in response to CD95L occurs mostly in a caspase-9-independent manner, and (ii) caspase-9 plays a critical role in ceramide-triggered apoptosis in Jurkat leukemia cells.

CD95 stimulation is associated with alterations of sphingolipid metabolism, leading notably to the accumulation of pro-apoptotic sphingolipid metabolites such as ceramide, gangliosides and sphingosine.¹³ The molecular mechanisms for production of such metabolites as well as their roles in CD95 signaling remain to be fully established. Sphingomyelin breakdown to ceramide, as a consequence of sphingomyelinase activation, is likely involved in the early ceramide generation (within the first hour of CD95 stimulation).⁴⁵ Different groups have reported that CD95 engagement by anti-CD95 antibodies acting as agonistic molecules, is also accompanied by a late intracellular ceramide increase, concomitantly to apoptosis induction in Jurkat cells.^{19, 20} Fumonisin B1, an inhibitor of ceramide synthases, blocks late intracellular ceramide formation, indicating that *de novo* ceramide synthesis likely accounts for this phenomenon.²¹ We recently provided evidence for the existence of an alternative mechanism of ceramide production in CD95 signaling, associated with the caspase-dependent inhibition of sphingomyelin synthesis.²² The latter event occurred as early as 15 min post-CD95 stimulation and was prolonged till cell dismantling.²²

CD95-triggered ceramide generation likely appears as a caspase-dependent event. As a matter of fact, ceramide increase (i) was abolished by the broad-spectrum caspase inhibitor zVAD-fmk,^{21, 23} (ii) did not occur in caspase-8 deficient Jurkat cells,¹⁹ and (iii) was abrogated in FLIP_L-overexpressing cells.²³ In contrast, the

caspase-9 inhibitor peptide zLEHD-fmk, did not potently inhibit anti-CD95-triggered ceramide increase in Jurkat cells,²³ indicating that CD95 triggers ceramide increase mostly in a caspase-9-independent manner. One should note, however, that caspase-9 inhibitor peptides lack specificity and may not be potent enough to fully block caspase-9 activation.⁴⁶ In addition, agonistic anti-CD95 antibodies may trigger different signaling pathways as compared to the natural receptor ligand CD95L.^{47, 48}

Herein, we have re-evaluated the role of caspase-9 in CD95-triggered ceramide increase in CD95 signaling based on the use of CD95L and caspase-9-deficient Jurkat cells. Whereas ceramide generation and cell death were abrogated in caspase-8 and -10 doubly deficient cells, CD95L-induced ceramide accumulation was marginally affected in caspase-9-deficient Jurkat cells as compared to their wild-type counterparts. Thus, our data provide genetic evidence, for the first time, that CD95L-induced ceramide generation occurs downstream of apical caspases, mostly in a caspase-9-independent manner. Interestingly, caspase-9-deficient Jurkat cells significantly resisted CD95L-induced apoptosis, despite strong ceramide accumulation, indicating that ceramide increase is unlikely a mere consequence of cell death. This tenet is in agreement with a previous report, showing that, whereas the effector caspase inhibitor peptide DEVD-CHO fully abrogated apoptosis in Jurkat cells, it did not prevent ceramide increase triggered by CD95 engagement.²⁰

Our observations also show that late ceramide accumulation was enhanced in SMS1 knockdown Jurkat cells, SMS1 being able to convert ceramide to sphingomyelin.^{49, 50} Of particular interest was the finding that CD95-triggered cytochrome c release from the mitochondria and caspase cascade activation were enhanced in SMS1 knockdown Jurkat cells. This suggests that, in typical type 2 Jurkat leukemia T cells challenged with CD95L, ceramide may participate in the

activation of the mitochondrial pro-apoptotic pathway. Accordingly, exogenous ceramides, including the short chain analogue C2-ceramide and the natural C16-ceramide, elicit caspase-9 activation in Jurkat cells. The critical role of caspase-9 activation in pro-apoptotic ceramide signaling is evidenced by the resistance of caspase-9-deficient Jurkat cells to exogenous ceramide, despite mitochondrial membrane permeability increase, as illustrated by cytochrome c release. Finally, genetic correction of caspase-9-deficient Jurkat cells could restore exogenous ceramide-induced apoptosis.

Altogether, our results indicate that CD95L-triggered ceramide increase is an apical caspase-dependent event and likely facilitates cytochrome c release from the mitochondria leading to caspase-9 activation. Thus, ceramide generation in CD95 signaling may enhance the canonical mitochondrial pathway, which involves apical caspase-induced Bid cleavage.

Acknowledgements. We thank Dr. J. Blenis (Boston, MA, USA) for providing A3 and I9-2 Jurkat cells. This study was supported by INSERM, Paul Sabatier University, and ANR (SphingoDR program).

References

1. Bouillet P, O'Reilly LA. CD95, BIM and T cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2009;9:514-9.
2. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998;17:1675-87.
3. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996;85:817-27.
4. Vincenz C, Dixit VM. Fas-associated death domain protein interleukin-1beta-converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling. *J Biol Chem* 1997;272:6578-83.
5. Muzio M, Salvesen GS, Dixit VM. FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem* 1997;272:2952-6.
6. Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7464-9.
7. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 2001;276:46639-46.
8. Fischer U, Stroh C, Schulze-Osthoff K. Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene* 2006;25:152-9.
9. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501.
10. Milhas D, Cuvillier O, Therville N, Clave P, Thomsen M, Levade T, Benoist H, Segui B. Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2005;280:19836-42.
11. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998;94:481-90.
12. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-89.
13. Segui B, Andrieu-Abadie N, Jaffrezou JP, Benoist H, Levade T. Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758:2104-20.
14. Ekiz HA, Baran Y. Therapeutic applications of bioactive sphingolipids in hematological malignancies. *Int J Cancer* 2010;127:1497-506.
15. Cremesti A, Paris F, Grassme H, Holler N, Tschopp J, Fuks Z, Gulbins E, Kolesnick R. Ceramide enables fas to cap and kill. *J Biol Chem* 2001;276:23954-61.
16. Grassme H, Cremesti A, Kolesnick R, Gulbins E. Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene* 2003;22:5457-70.
17. Cock JG, Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J. CD95 (Fas/APO-1) induces ceramide formation and apoptosis in the absence of a functional acid sphingomyelinase. *J Biol Chem* 1998;273:7560-5.

18. Bezombes C, Segui B, Cuvillier O, Bruno AP, Uro-Coste E, Gouaze V, Andrieu-Abadie N, Carpentier S, Laurent G, Salvayre R, Jaffrezou JP, Levade T. Lysosomal sphingomyelinase is not solicited for apoptosis signaling. *FASEB J* 2001;15:297-9.
19. Juo P, Woo MS, Kuo CJ, Signorelli P, Biemann HP, Hannun YA, Blenis J. FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. *Cell Growth Differ* 1999;10:797-804.
20. Tepper AD, Cock JG, de Vries E, Borst J, van Blitterswijk WJ. CD95/Fas-induced ceramide formation proceeds with slow kinetics and is not blocked by caspase-3/CPP32 inhibition. *J Biol Chem* 1997;272:24308-12.
21. Cuvillier O, Edsall L, Spiegel S. Involvement of sphingosine in mitochondria-dependent Fas-induced apoptosis of type II Jurkat T cells. *J Biol Chem* 2000;275:15691-700.
22. Lafont E, Milhas D, Carpentier S, Garcia V, Jin ZX, Umehara H, Okazaki T, Schulze-Osthoff K, Levade T, Benoist H, Segui B. Caspase-mediated inhibition of sphingomyelin synthesis is involved in FasL-triggered cell death. *Cell Death Differ* 2010;17:642-54.
23. Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J. Ordering of ceramide formation, caspase activation, and mitochondrial changes during CD95- and DNA damage-induced apoptosis. *J Clin Invest* 1999;103:971-8.
24. Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 2000;14:729-39.
25. Movsesyan VA, Yakovlev AG, Dabaghyan EA, Stoica BA, Faden AI. Ceramide induces neuronal apoptosis through the caspase-9/caspase-3 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299:201-7.
26. Zundel W, Giaccia A. Inhibition of the anti-apoptotic PI(3)K/Akt/Bad pathway by stress. *Genes Dev* 1998;12:1941-6.
27. Ruvolo PP, Deng X, Ito T, Carr BK, May WS. Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J Biol Chem* 1999;274:20296-300.
28. Chalfant CE, Ogretmen B, Galadari S, Kroesen BJ, Pettus BJ, Hannun YA. FAS activation induces dephosphorylation of SR proteins; dependence on the de novo generation of ceramide and activation of protein phosphatase 1. *J Biol Chem* 2001;276:44848-55.
29. Chalfant CE, Rathman K, Pinkerman RL, Wood RE, Obeid LM, Ogretmen B, Hannun YA. De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 2002;277:12587-95.
30. Ferrari D, Pinton P, Campanella M, Callegari MG, Pizzirani C, Rimessi A, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. Functional and structural alterations in the endoplasmic reticulum and mitochondria during apoptosis triggered by C2-ceramide and CD95/APO-1/FAS receptor stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:575-81.
31. Ghafourifar P, Klein SD, Schucht O, Schenk U, Pruschy M, Rocha S, Richter C. Ceramide induces cytochrome c release from isolated mitochondria. Importance of mitochondrial redox state. *J Biol Chem* 1999;274:6080-4.
32. Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M. Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion* 2006;6:118-25.

33. Lee H, Rotolo JA, Mesicek J, Penate-Medina T, Rimner A, Liao WC, Yin X, Ragupathi G, Ehleiter D, Gulbins E, Zhai D, Reed JC, et al. Mitochondrial Ceramide-Rich Macrod domains Functionalize Bax upon Irradiation. *PLoS One* 2011;6:e19783.
34. Novgorodov SA, Szulc ZM, Luberto C, Jones JA, Bielawski J, Bielawska A, Hannun YA, Obeid LM. Positively charged ceramide is a potent inducer of mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem* 2005;280:16096-105.
35. Kristal BS, Brown AM. Apoptogenic ganglioside GD3 directly induces the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 1999;274:23169-75.
36. Yuan H, Williams SD, Adachi S, Oltersdorf T, Gottlieb RA. Cytochrome c dissociation and release from mitochondria by truncated Bid and ceramide. *Mitochondrion* 2003;2:237-44.
37. Novgorodov SA, Gudz TI, Obeid LM. Long-chain ceramide is a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 2008;283:24707-17.
38. Nica AF, Tsao CC, Watt JC, Jiffar T, Kurinna S, Jurasz P, Konopleva M, Andreeff M, Radomski MW, Ruvolo PP. Ceramide promotes apoptosis in chronic myelogenous leukemia-derived K562 cells by a mechanism involving caspase-8 and JNK. *Cell Cycle* 2008;7:3362-70.
39. Shimizu M, Fontana A, Takeda Y, Yagita H, Yoshimoto T, Matsuzawa A. Induction of antitumor immunity with Fas/APO-1 ligand (CD95L)-transfected neuroblastoma neuro-2a cells. *J Immunol* 1999;162:7350-7.
40. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* 1998;8:1001-8.
41. Lafont E, Milhas D, Teissie J, Therville N, Andrieu-Abadie N, Levade T, Benoist H, Segui B. Caspase-10-dependent cell death in Fas/CD95 signalling is not abrogated by caspase inhibitor zVAD-fmk. *PLoS One* 2010;5:e13638.
42. Samraj AK, Keil E, Ueffing N, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2006;281:29652-9.
43. Jin ZX, Huang CR, Dong L, Goda S, Kawanami T, Sawaki T, Sakai T, Tong XP, Masaki Y, Fukushima T, Tanaka M, Mimori T, et al. Impaired TCR signaling through dysfunction of lipid rafts in sphingomyelin synthase 1 (SMS1)-knockdown T cells. *Int Immunol* 2008;20:1427-37.
44. Paris F, Grassme H, Cremesti A, Zager J, Fong Y, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Gulbins E, Kolesnick R. Natural ceramide reverses Fas resistance of acid sphingomyelinase(-/-) hepatocytes. *J Biol Chem* 2001;276:8297-305.
45. Cifone MG, Roncaioli P, De Maria R, Camarda G, Santoni A, Ruberti G, Testi R. Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal. *EMBO J* 1995;14:5859-68.
46. McStay GP, Salvesen GS, Green DR. Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death Differ* 2008;15:322-31.
47. Legembre P, Beneteau M, Daburon S, Moreau JF, Taupin JL. Cutting edge: SDS-stable Fas microaggregates: an early event of Fas activation occurring with agonistic anti-Fas antibody but not with Fas ligand. *J Immunol* 2003;171:5659-62.

48. Chaigne-Delalande B, Mahfouf W, Daburon S, Moreau JF, Legembre P. CD95 engagement mediates actin-independent and -dependent apoptotic signals. *Cell Death Differ* 2009;16:1654-64.
49. Huitema K, van den Dikkenberg J, Brouwers JF, Holthuis JC. Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J* 2004;23:33-44.
50. Yamaoka S, Miyaji M, Kitano T, Umehara H, Okazaki T. Expression cloning of a human cDNA restoring sphingomyelin synthesis and cell growth in sphingomyelin synthase-defective lymphoid cells. *J Biol Chem* 2004;279:18688-93.

Legends to Figures

Figure 1: Caspase-9 is dispensable for ceramide generation in CD95 signaling.

A, Protein extracts derived from wild-type (WT), caspase-8 and -10-doubly-deficient ($\Delta C8/10$) or caspase-9-deficient ($\Delta C9$) Jurkat cells were analysed by Western blotting using anti-caspase-8, anti-caspase-9 or anti- β -actin antibodies. B, C, Cells were incubated in the presence of 50 ng/mL (B) or 500 ng/mL (C) CD95L for 8 hours. Ceramide content and cell viability were measured by the DAG kinase method and MTT test, respectively. Data are means \pm sem of three independent experiments (**: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, as compared to untreated cells).

Figure 2: CD95L-induced ceramide generation, cytochrome c release from mitochondria and cascade caspase activation are enhanced in SMS1 knockdown Jurkat cells.

A, SMS1 KD Jurkat cells were incubated in the presence of 2.5 μ M C6-NBD-ceramide for 2 hours. SM synthase (SMS) and GlcCer synthase (GCS) activities were determined by quantifying fluorescent SM and GlcCer. SMS and GCS activities in SMS1KD Jurkat cells are expressed as the percentage of those measured in control Jurkat cells, and data are means \pm sem of four independent experiments. B, SMS1 KD and control (cnt) Jurkat cells were incubated for the indicated times with 100 ng/mL CD95L. Ceramide content was evaluated by the DAG kinase assay and is expressed as percent of untreated cells. Data are means \pm sem of three independent experiments. C, SMS1 KD and control (cnt) Jurkat cells were incubated for the indicated times with 10 ng/mL CD95L. Then, cells were stained with DAPI and anti-cytochrome c antibody, and analyzed by fluorescence microscopy. Percentages of cells having diffuse cytochrome c staining and fragmented nuclei were determined.

Data are means \pm sem of four independent experiments. D, SMS1 KD and control (cnt) Jurkat cells were incubated with the indicated concentrations of CD95L for 8 hours. Protein extracts were analyzed by western blot using anti-caspase-8, caspase-9, caspase-3, PARP and β -actin antibodies.

Figure 3: C2-ceramide induces apoptosis in a caspase-9-dependent manner.

Wild-type (WT), caspase-8-deficient (Δ C8), caspase-8 and -10-doubly-deficient (Δ C8/10) and caspase-9-deficient (Δ C9) Jurkat cells were incubated for 16 hours in the presence of C2-ceramide (10 μ M or as indicated). A and B, Cell viability was evaluated by the MTT test and is expressed as % of untreated cells. Data are representative of two independent experiments (A) and are means \pm sem of three independent experiments (**: $p < 0.01$) (B). C and D, Wild-type (WT) and caspase-9-deficient (Δ C9) Jurkat cells were incubated for 6 hours in the presence or absence of 10 μ M C2-ceramide (C2-Cer). Protein extracts were analyzed by Western blotting using anti-caspase-9 and -3 antibodies (C). The cell morphology was evaluated under fluorescence microscopy after Syto13 and propidium iodide staining (D). Data are representative of two independent experiments.

Figure 4: Analysis of C2-ceramide-induced apoptosis and cytochrome c release in caspase-9-deficient Jurkat cells.

WT Jurkat cells and caspase-9-deficient (Δ C9) Jurkat cells were treated with or without 10 μ M C2-ceramide for 6 hours and stained with DAPI and anti-cytochrome c antibody and analyzed by fluorescence microscopy. A, Pictures are from one representative experiment. B, Percentages of cells with fragmented nuclei and diffuse cytochrome c staining were

determined. Data are means \pm sem of 3 independent experiments (*: $p < 0.05$; n.s.: not significant).

Figure 5: Expression of caspase-9 restores C2-ceramide-induced apoptosis in caspase-9-deficient Jurkat cells. A, Caspase-9-deficient ($\Delta C9$) Jurkat cells and their stably corrected counterparts ($\Delta C9+$) were incubated in the presence or absence of 10 μM C2-ceramide. After 16 hours, cell viability was evaluated by the MTT assay. Data are means \pm sem of three independent experiments. Inset, protein extracts were analyzed by Western blotting using anti-caspase-9 or β -actin antibodies. B, $\Delta C9+$ cells were incubated for 6 hours in the presence or absence of 10 μM C2-ceramide and protein extracts were western blotted using anti-caspase-9 and anti-caspase-3 antibodies. C, $\Delta C9+$ cells were incubated for 6 hours in the presence or absence of 10 μM C2-ceramide, stained with Syto 13 and propidium iodide and analyzed by fluorescence microscopy.

Figure 6: C16-ceramide-induced apoptosis is impaired in caspase-9-deficient Jurkat cells. A and B, Wild-type Jurkat cells were incubated in the presence of C16-ceramide (C16-Cer, 10 μM) or vehicle for 6 hours. A, Protein extracts were western blotted using anti-caspase-9 or caspase-3 antibodies. B, Cells were stained with DAPI and analyzed by fluorescence microscopy. Arrows indicate cells displaying nuclear condensation and/or fragmentation. C and D, Wild-type (WT) and caspase-9-deficient ($\Delta C9$) Jurkat cells were incubated in the presence of vehicle or the indicated C16-ceramide concentrations for 6 hours. Cells were labeled with Annexin-V/FITC and propidium iodide, and analyzed by flow cytometry. C, Data are from a representative experiment of three independent experiments. D, Cells labeled either

with Annexin-V or propidium iodide were considered as dead; data are means \pm sem of 3 independent experiments (*: $p < 0.05$; n.s.: not significant).

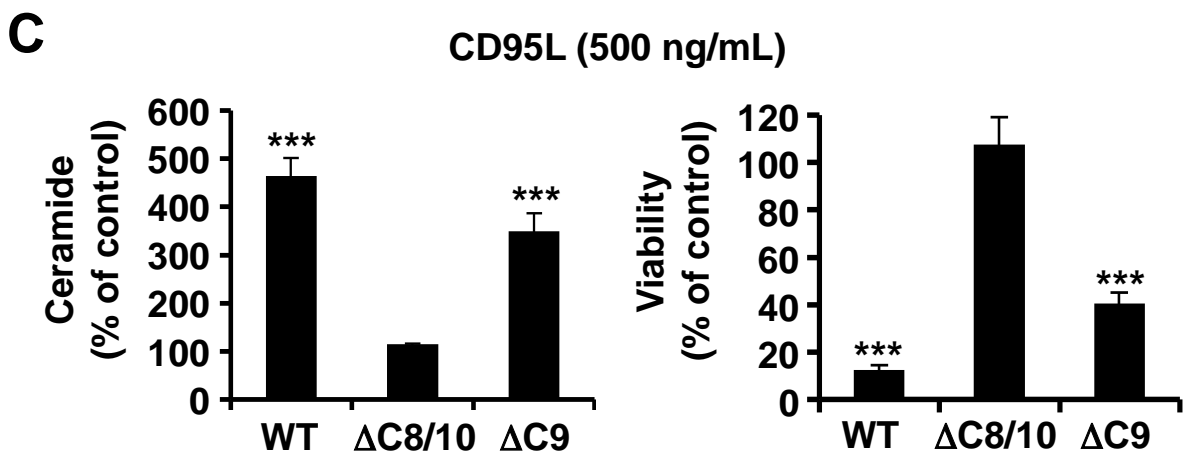
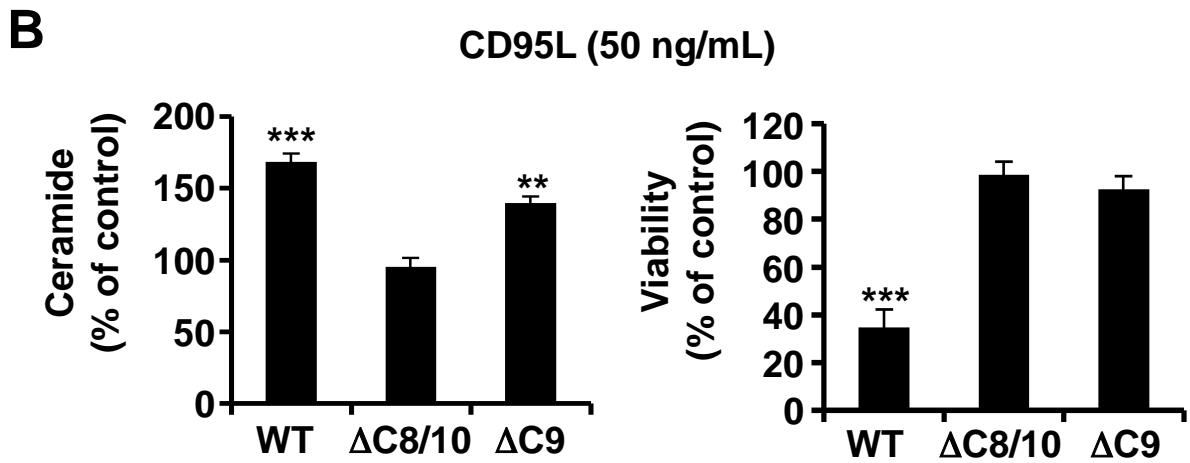
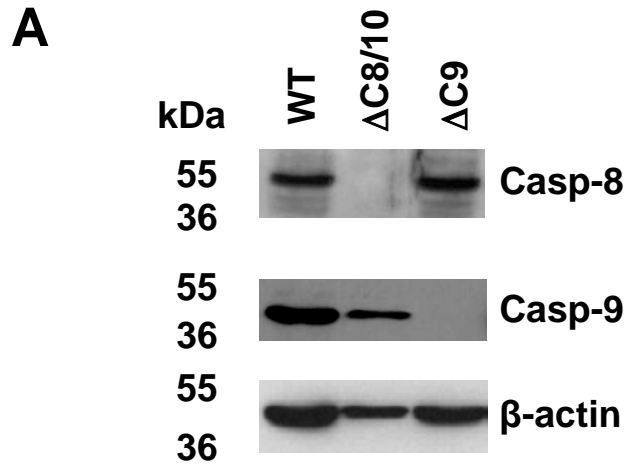


Figure 1

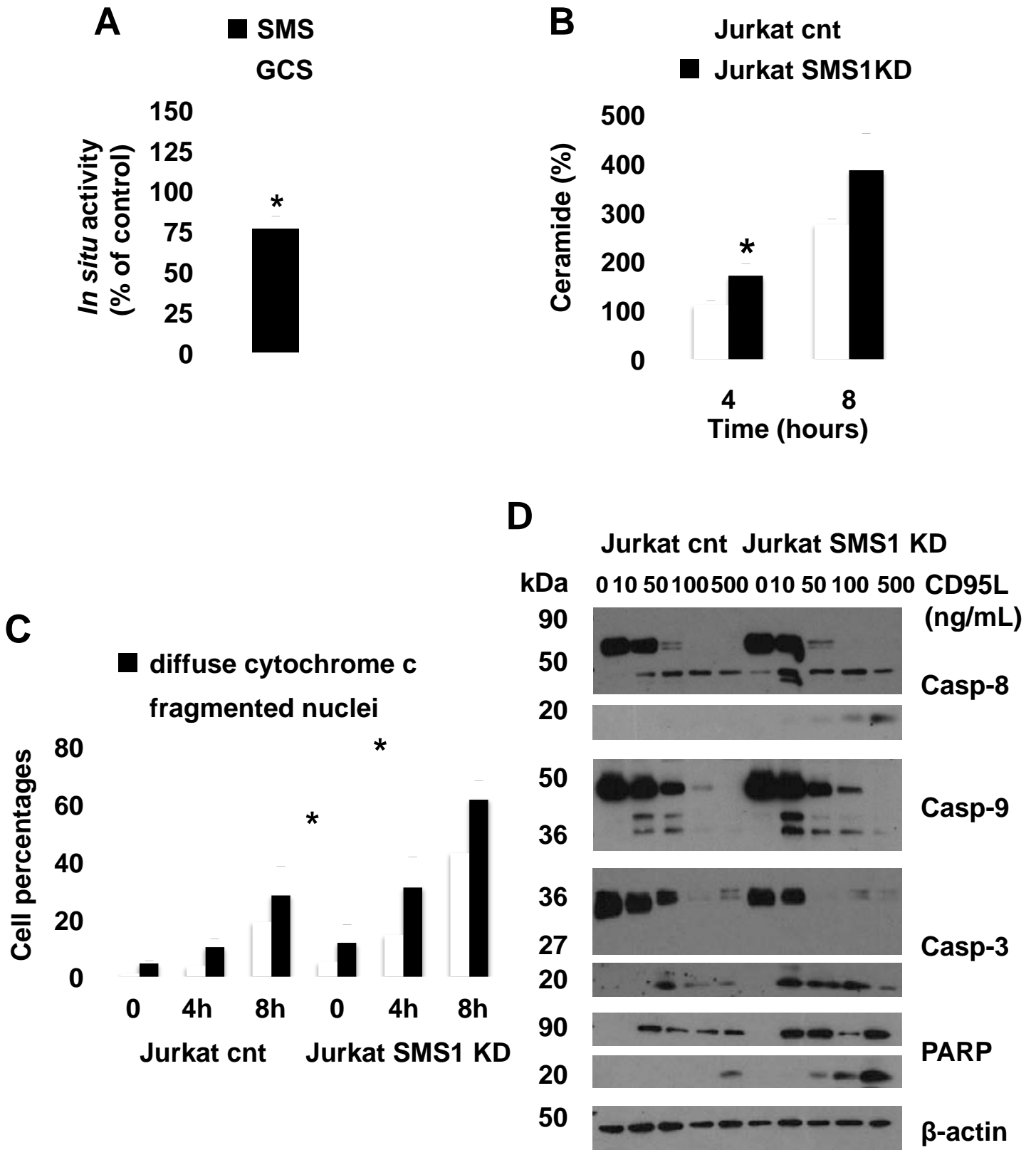


Figure 2

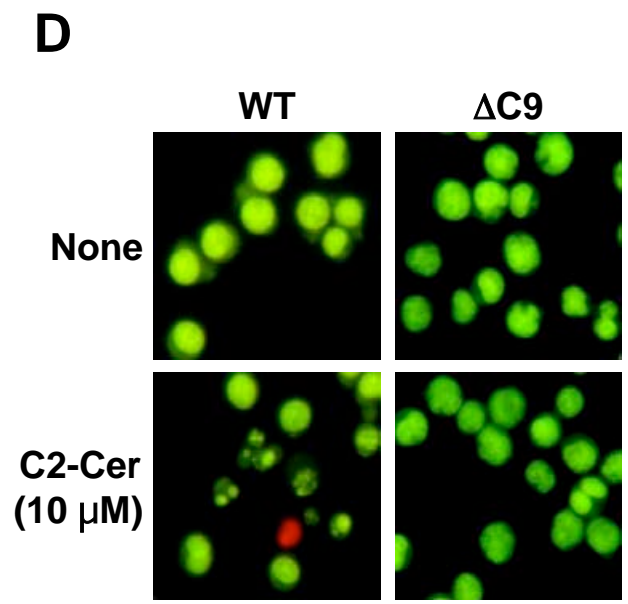
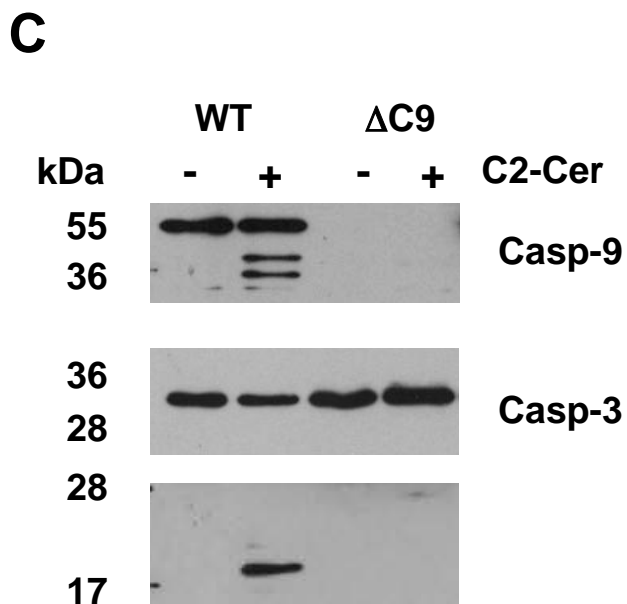
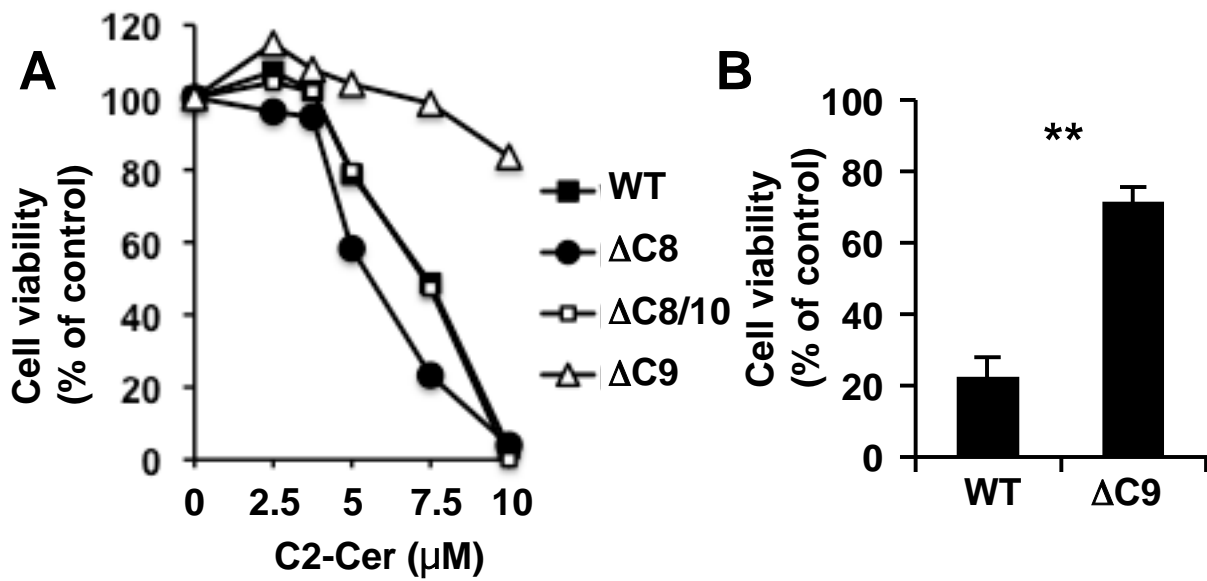
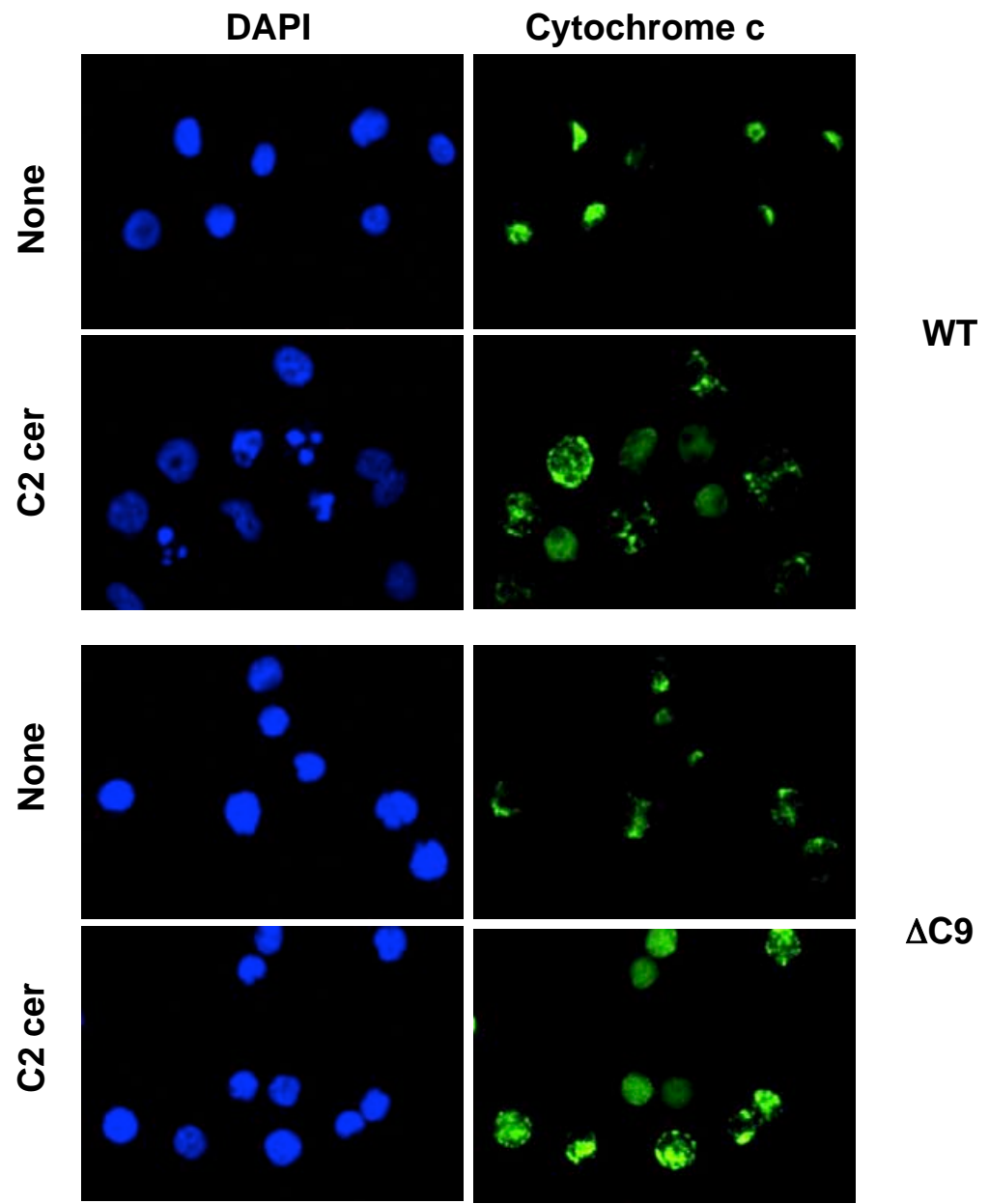


Figure 3

Lafont et al.

□

A



B

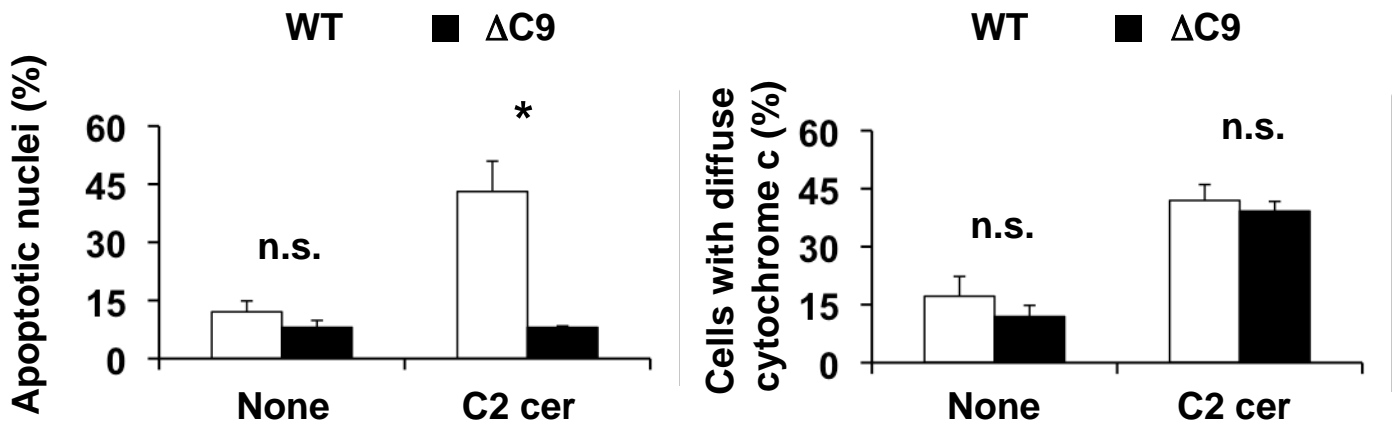


Figure 4

Lafont et al.

□

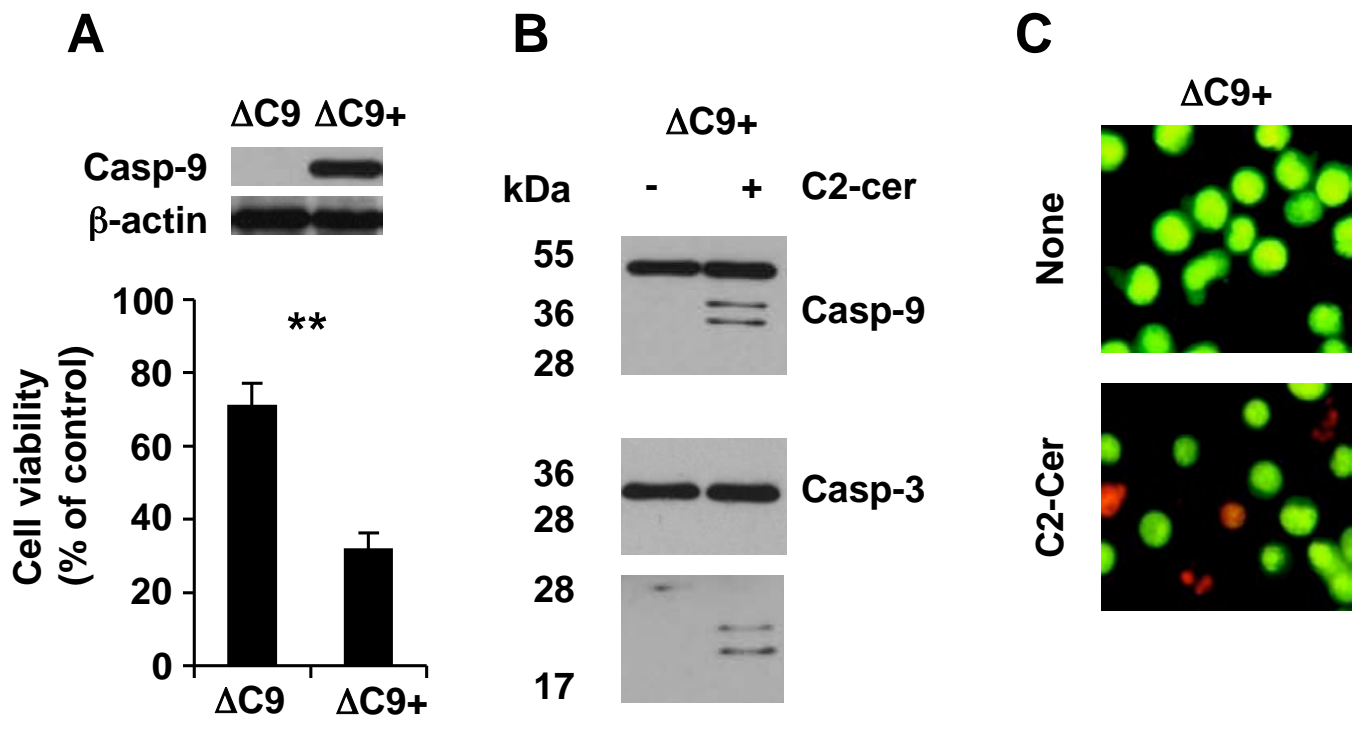


Figure 5

Lafont et al.

□

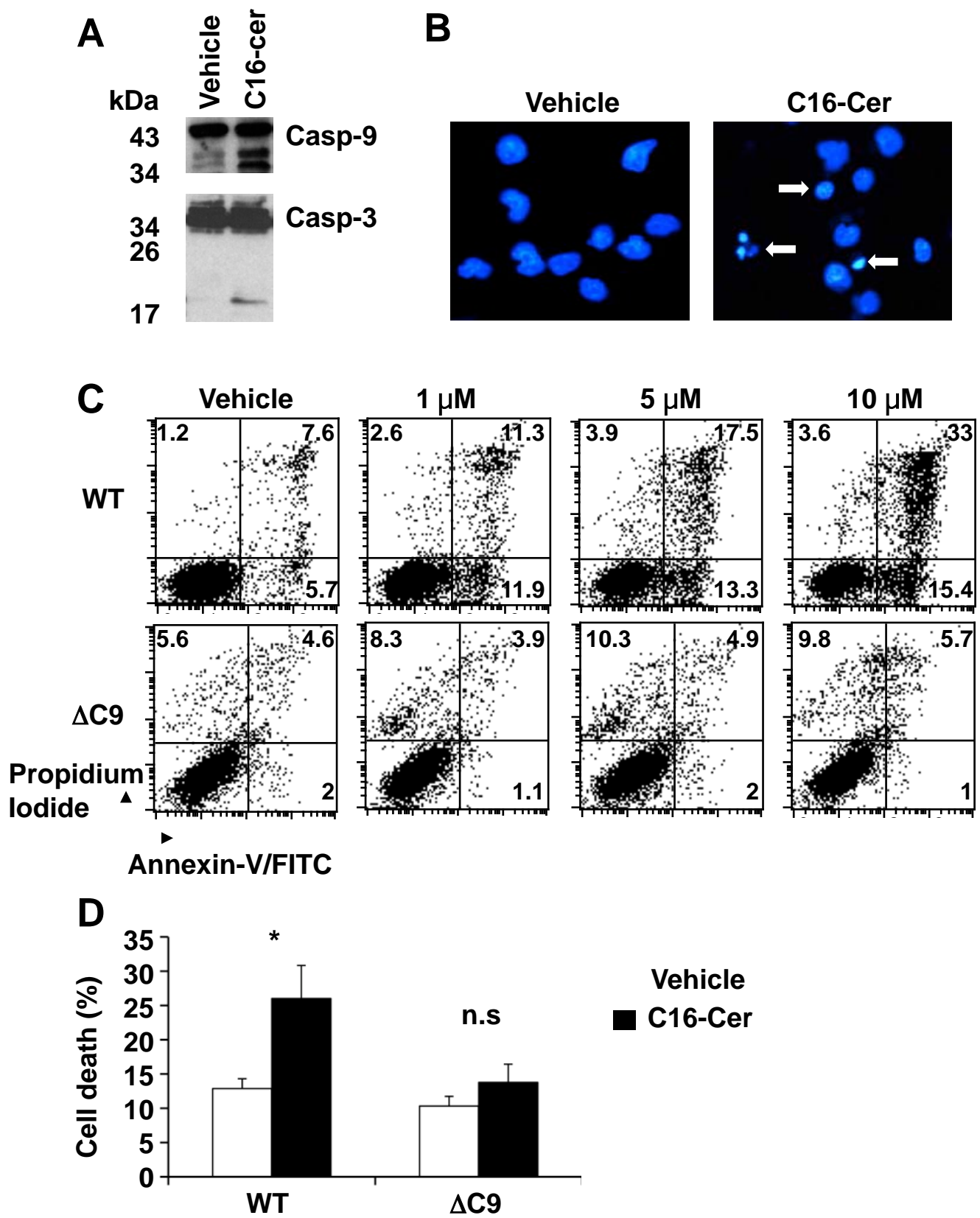


Figure 6

Lafont et al.

IV.2. Conclusion de l'article 3 :

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que CD95L induit une accumulation de céramide qui dépend des caspases 8 et 10 mais pas de la caspase 9. Quelque soit la dose de CD95L testée (50 ou 500 ng/mL), l'accumulation de céramide est inhibée dans des cellules doublement déficientes en caspases 8 et 10 tandis que la déficience en caspase 9 n'affecte pas l'accumulation de ce lipide. A l'inverse, les cellules déficientes en caspase 9 résistent à la perte de viabilité induite par 50 ng/mL de CD95L tandis qu'elles sont sensibles à 500 ng/mL. Ces résultats suggèrent d'une part que la production de céramide a lieu en aval des caspases 8 et 10 dans la signalisation de CD95 et en amont de la caspase 9. Ceci est en accord avec nos observations précédentes (cf. article 2) et avec les données de la littérature. En effet, Tepper et ses collaborateurs indiquent que l'accumulation de céramide dépendante de CD95 est inhibée par le zVAD-fmk ou par la surexpression de FlipL mais pas par un inhibiteur des caspases effectrices (Tepper *et al.*, 1999 ; Tepper *et al.*, 1997). De plus, le groupe de Blenis a mis en évidence que l'accumulation de céramide dépendante de CD95 était inhibée dans des cellules déficientes en caspase 8. Toutefois, notre étude est, à notre connaissance, la première mise en évidence génétique de l'absence d'implication de la caspase 9 dans cette accumulation. D'autre part, nos résultats suggèrent que l'accumulation de céramide, même tardive, n'est pas une simple conséquence de la mort cellulaire. Nous avons également mis en évidence que les cellules exprimant de façon stable un siRNA dirigé contre la SMS1 accumulent plus de céramide, présentent un relargage du cytochrome c et une activation des caspases en particulier de la caspase 9 et 3 exacerbés en réponse à CD95L comparé à des cellules contrôles. Ceci confirme nos observations précédentes (cf. article 2) et suggère également que l'accumulation de céramide dans la signalisation de CD95 pourrait favoriser l'activation de la voie mitochondriale dans les cellules Jurkat, cellules de type II. De façon intéressante, les cellules déficientes en caspase 9, contrairement aux cellules doublement déficientes en caspases 8 et 10 résistent à l'apoptose induite par le C2-céramide. Par ailleurs, les cellules déficientes en caspase 9 présentent un relargage du cytochrome c comparable à des cellules contrôles en réponse au C2-céramide, tandis que l'apoptose nucléaire est clairement inhibée par la déficience en caspase 9, suggérant que cette protéase joue un rôle majeur dans l'induction de l'apoptose par le céramide au niveau post-mitochondrial. La réexpression de la caspase 9 dans des cellules déficientes restaure leur sensibilité à l'apoptose induite par le C2-céramide, indiquant que nos observations ne sont pas liées à un effet clone. Enfin, la déficience en caspase 9 confère également une résistance vis-à-vis du C16-céramide naturel,

qui est le céramide majoritaire dans les cellules Jurkat et celui qui s'accumule le plus en réponse à CD95L (cf. article 2). Ces résultats suggèrent donc que l'accumulation de céramide dépendante de CD95 est un événement proximal de signalisation, dépendant des caspases initiateuses 8 et 10 mais pas de la caspase 9. Cette accumulation pourrait favoriser les événements mitochondriaux de l'apoptose, tels que le relargage du cytochrome c qui permet l'activation de la caspase 9, protéase dont l'activation semble cruciale dans la mort dépendante d'une élévation de céramide.

DISCUSSION

Dans la première partie de cette thèse, nous avons cherché à évaluer le rôle des caspases initiatrices 8 et 10 dans la mort cellulaire dépendante de CD95. Nos résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle la caspase 10 jouerait un rôle de caspase initiatrice fonctionnellement impliquée dans la mort apoptotique induite par CD95L. Ces résultats suggèrent également que cette caspase participerait à la mort induite par ce ligand en présence de zVAD-fmk, jusqu'ici considérée, à tort, comme caspase-indépendante.

La caspase 10 n'est pas exprimée chez la souris et on ne dispose donc pas d'animaux déficients pour cette protéine, dont les fonctions physiologiques doivent vraisemblablement être assurées par une autre protéine, potentiellement la caspase 8. Chez l'Homme, la caspase 10 pourrait à la fois jouer des rôles redondants de ceux de la caspase 8, mais également des rôles distincts. Tout comme la caspase 8, avec laquelle elle partage un locus génétique commun sur le chromosome 2, la caspase 10 est recrutée au sein du DISC des TRAILRs et de CD95 de façon FADD dépendante et toutes deux sont capables de cliver Bid (Milhas *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2001 ; Kischkel, 2001 ; Sprick *et al.*, 2002). Les recrutements de ces deux caspases au sein du DISC sont toutefois indépendants l'un de l'autre (Kischkel, 2001). La caspase 10 peut, non seulement cliver Bid au même site de clivage que la caspase 8 pour générer la forme p15 t-Bid, mais elle est également capable de cliver Bid au même site de clivage que la granzyme B, ce qui suggère que la caspase 10 pourrait, d'une part compenser une absence ou une mutation de la caspase 8 pour le clivage de Bid, mais également assurer le clivage d'une protéine Bid mutée sur le site consensus de clivage pour la caspase 8 (Fischer *et al.*, 2005). De façon intéressante, il a été observé que certains patients souffrant d'ALPS présentent des mutations de la caspase 10, suggérant qu'une ou plusieurs des fonctions de cette protéine en faveur de la mort cellulaire ne peuvent être compensées par la caspase 8, exprimée normalement dans les cellules de ces patients (Wang *et al.*, 1999). Des mutations de la caspase 8 induisent un syndrome proche des ALPS ainsi qu'un défaut d'activation des cellules B, T et des NK qui favorise l'apparition récurrente d'infections virales et bactériennes. Ces observations suggèrent qu'*in vivo*, chez l'Homme, la caspase 8 possède certaines fonctions différentes de la caspase 10 (Chun *et al.*, 2002). De façon intéressante, les patients souffrant d'ALPS ont un risque accru de développer des lymphomes, renforçant l'importance de la mort dépendante de CD95 dans la limitation de l'apparition de cancers (au

moins dans le compartiment lymphoïde). De plus, l'équipe d'Avi Ashkenazi a mis en évidence sur 35 lignées cellulaires de carcinomes pulmonaires que seules 20 exprimaient la caspase 10 contre 29 pour la caspase 8 au niveau protéique. De même, sur 20 lignées de carcinomes mammaires, toutes expriment la caspase 8 tandis que seules 4 d'entre elles présentent une expression nette de la caspase 10. Face à ces observations, les auteurs ont proposé qu'une expression faible ou nulle de la caspase-10 constitue un mécanisme d'échappement à l'apoptose des cellules cancéreuses (Kischkel, 2001). Certaines études ont également mis en évidence la présence de mutations inactivatrices de la caspase 10 dans des échantillons de cancers gastriques et de lymphomes non-Hodgkiniens (Park *et al.*, 2002 ; Shin *et al.*, 2002). Ces études suggèrent donc que la caspase 10, qui pourrait également participer à la mort cellulaire induite par certaines chimiothérapies, posséderait un rôle anti-tumoral.

Plusieurs équipes ont cherché à comprendre si la caspase 10 pouvait permettre l'induction de mort dépendante des DR en l'absence de caspase 8 dans des cellules cancéreuses. Ainsi, des auteurs ont observé que des cellules Jurkat déficientes en caspase 8 transfectées pour exprimer la caspase 10, meurent par apoptose dépendante de CD95 dans le cas d'un signal suffisamment prolongé, ce qui suggère que cette caspase est bien capable de se substituer à la caspase 8 pour l'induction de mort, mais qu'il existe probablement un taux seuil d'activation de la caspase 10 à atteindre pour l'induction de l'apoptose (Kischkel, 2001). En 2001, l'équipe de Michael J Lenardo a également mis en évidence dans les cellules I9-2 que l'expression des caspases 8 ou 10 seules permet de les sensibiliser à la mort induite par CD95L (Wang *et al.*, 2001). Dans des cellules HeLa, la surexpression d'une caspase 10 fonctionnelle s'accompagne d'une induction d'apoptose alors que l'expression des caspases présentant des mutations ponctuelles inactivatrices, correspondantes à celles observées chez les deux patients souffrant d'ALPS-CASP10 décrits dans cette étude, n'induit pas ou peu de toxicité (Wang *et al.*, 1999). Il a également été suggéré que la caspase 10 participait à l'induction d'apoptose par TRAIL (Wang *et al.*, 2001 ; Engels *et al.*, 2005). En effet, les lymphocytes T de patients atteints d'ALPS-CASP10 sont non seulement résistants à l'apoptose induite par CD95L, mais également à l'apoptose induite par TRAIL, renforçant l'idée selon laquelle la caspase 10 participe à l'apoptose dépendante de ces DR, et que des formes mutées de cette protéine exercent un effet dominant négatif.

Toutefois, l'implication de la caspase 10 dans l'apoptose dépendante de CD95 et TRAIL a été remise en cause (Sprick *et al.*, 2002). Plusieurs hypothèses peuvent être émises

pour expliquer les différences de résultats obtenus dans les travaux évaluant le rôle de cette protéine dans la mort cellulaire dépendante de CD95. Tout d'abord, les niveaux d'expression de la caspase 10 diffèrent d'une étude à l'autre : certains travaux se sont attachés à exprimer la caspase 10 à des niveaux faibles, voire inférieurs à ceux physiologiquement trouvés dans les cellules parentales. En ce sens, il est possible que dans des cellules déficientes en caspase 8, il soit nécessaire d'atteindre un certain seuil de caspase 10 activée pour compenser la perte en caspase 8 et que l'expression soit trop faible dans certains des clones générés. En outre, ceci rejoindrait également les observations selon lesquelles une stimulation faible de CD95 induit plutôt des voies en faveur de la survie cellulaire (Lavrik *et al.*, 2007). Dans notre étude, nous avons choisi d'évaluer à la fois la réponse de cellules exprimant des niveaux faibles de caspases (en utilisant des cellules I9-2d, l'exprimant naturellement ou des HeLa caspases 10 transfectées de façon stable), ou au contraire, de cellules l'exprimant fortement (en utilisant des cellules Jurkat et HeLa transfectées de façon transitoire). Par ailleurs, il est important de souligner que la génération de clones transfectés de façon stable peut s'accompagner de la sélection de cellules ayant acquis des caractéristiques « de compensation », dont des modifications de l'expression de membres anti ou pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 ou d'inhibiteurs cellulaires des caspases, qui pourrait influencer la signalisation de CD95 de façon importante. Il pourrait ainsi être intéressant de tester la sensibilité des différents clones réexprimant la caspase 10 mentionnés dans la littérature à d'autres molécules cytotoxiques, notamment de chimiothérapie, afin de s'assurer de l'absence de ce type de modification. Il est également important de noter que les types d'agonistes de CD95 diffèrent entre les diverses études, or ces agonistes induisent des événements moléculaires différents qui pourraient conditionner l'intervention de la caspase 10 (Legembre *et al.*, 2003).

Nos résultats suggèrent également que la caspase 10, dont l'activation n'est pas efficacement inhibée par le zVAD-fmk, pourrait participer à la mort cellulaire dépendante de CD95 jusqu'ici considérée comme « caspase indépendante ». Le mécanisme d'implication de la caspase 10 dans la mort ayant lieu en présence de zVAD-fmk reste à déterminer. La plupart des études décrivant la mort cellulaire caspase-indépendante ont été réalisées, soit dans des cellules déficientes en caspase 8, soit dans des cellules parentales incubées en présence de zVAD-fmk. La morphologie des cellules mourant dans ces conditions est essentiellement nécrotique et cette mort cellulaire est dépendante de FADD et de RIP1 (Holler *et al.*, 2000). Cette mort impliquerait également la génération de ROS (Matsumura *et al.*, 2000). Dans notre étude, les cellules mourant en présence de CD95L et de zVAD-fmk présentent plutôt une

morphologie apoptotique. De façon intéressante, des auteurs indiquent que la perte des cIAPs sensibilise les cellules à la mort induite par CD95L et que cette mort ne peut être inhibée que par la présence conjointe d'inhibiteurs des caspases et de RIP1 (Geserick *et al.*, 2009). La caspase 10 est recrutée et pourrait potentiellement jouer des rôles de signalisation dans plusieurs complexes protéiques en plus du DISC, et des mutations inactivatrices de cette protéase pourraient donc aussi jouer des effets dominants négatifs au sein de divers macrocomplexes de signalisation.

De façon intéressante, deux études récentes ont mis en évidence que la perte des cIAPs favorise la formation d'un complexe nommé le ripoptosome, indépendamment de la ligation des DR (Bourteele *et al.*, 1998 ; Feoktistova *et al.*, 2011). Or, ce complexe comprend les protéines RIP1, FADD, la caspase 10, la caspase 8 et différentes isoformes de cFLIP et pourrait induire de la nécroptose ou de l'apoptose, selon l'isoforme de cFLIP présente au sein de ce complexe. Le rôle exact de la caspase 10 dans la formation, l'activité du ripoptosome et la détermination du destin cellulaire (apoptose, nécroptose, survie) par le ripoptosome n'a pas été évalué dans cette étude et reste à déterminer. Trois études ont mis en évidence que des composants du DISC, en l'occurrence FADD et la caspase 8, induirait un effet inhibiteur sur la fonction du nécrosome, complexe protéique comprenant RIP1 et RIP3, chez la souris (Kaiser *et al.*, 2011 ; Oberst *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2011). Par ailleurs, une étude dans la littérature indique que la caspase 8, mais pas la caspase 10, pourrait cliver RIP1 (Wang *et al.*, 2001) tandis qu'une autre indique que les deux caspases seraient capables de cliver cette protéine (Fischer *et al.*, 2005) et le potentiel inhibiteur de la caspase 10 vis-à-vis du nécrosome *via* le clivage de RIP1 reste donc à évaluer. Bien que l'existence du ripoptosome n'ait pas été mis en évidence dans la signalisation des DR, il pourrait être intéressant de réévaluer et de déterminer si la mort cellulaire ayant lieu en présence de zVAD-fmk ou en absence de caspase 8, et pouvant impliquer la caspase 10, dépend d'un effet régulateur, positif ou négatif, de la fonction du nécrosome. Par ailleurs, il est également possible que la mort apoptose-like observée en présence de CD95L et de zVAD-fmk *via* la caspase 10 soit la résultante de son activité résiduelle et de sa capacité à cliver Bid et à induire une perméabilisation de la membrane mitochondriale qui permet le relargage de facteurs tels que AIF ou endoG, dont la fonction conduit à l'apparition de caractéristiques morphologiques proches de celles de l'apoptose. L'implication de la perméabilisation mitochondriale et le relargage des facteurs mitochondriaux dans nos conditions expérimentales restent à évaluer. En outre, il serait intéressant de déterminer si des variations d'expression des différentes

formes de cFLIP influencent le type de mort cellulaire ayant lieu en présence de zVAD-fmk dans la signalisation de CD95.

Dans la seconde partie de cette thèse, nous avons cherché à comprendre le rôle du céramide et des SMS en tant que modulateurs de la mort dépendante des DR.

La synthèse de SM peut être modulée dans certaines conditions physiologiques et physiopathologiques. Cette activité a été rapportée comme étant augmentée au cours de la transformation cellulaire et dans des cellules leucémiques de patients chimiorésistants. Il est à noter qu'aucune autre donnée n'est connue quant à l'expression ou l'activité de ces enzymes dans les cellules cancéreuses et que ceci reste donc à déterminer. Des résultats de macroarray obtenus au sein de l'équipe (données non montrées) indiquent que l'expression de l'ARNm de la SMS1 serait significativement modifiée dans plus de 50% des échantillons cancéreux testés. Alors que 11% des échantillons présentaient des augmentations, 38% avaient une diminution de l'expression de l'ARNm de la SMS1. Bien que préliminaires, ces données indiquent une dérégulation de l'expression du gène de la SMS1, par des mécanismes transcriptionnels ou post-transcriptionnels qui restent à déterminer. Les conséquences de ces variations d'expression de l'ARN sont à évaluer au niveau protéique et enzymatique. De plus, nous souhaiterions étudier l'impact de ces variations d'expression sur divers processus biologiques comme la migration et la différenciation cellulaire.

L'activité de SM est inhibée par divers stress cellulaires, de façon directe, *via* une diminution de l'activité spécifique des SMS elles-mêmes, ou de façon indirecte, *via* un démantèlement de l'appareil de Golgi, ou *via* une phosphorylation de CERT, par exemple. Ces modulations joueraient potentiellement un rôle fonctionnel, permettant une résistance des cellules au stress environnementaux dans le cas d'une augmentation, ou au contraire, à une sensibilisation à ces stress dans le cas d'une inhibition de l'activité de synthèse de SM.

Nos résultats mettent en évidence une inhibition précoce de l'activité de synthèse de SM dans la signalisation de CD95, ce qui participerait à l'accumulation de céramide et à la mort induite par ce ligand. Concernant les mécanismes possibles d'inhibition, trois ont été mis en évidence par notre étude (Figure 36): (i) une inhibition de la synthèse de phosphatidylcholine, substrat des SMS, qui pourrait être la résultante d'un clivage caspase-

dépendant d'une ou plusieurs des enzymes responsables de sa synthèse en particulier la CCT-alpha, substrat connu des caspases (Lagace *et al.*, 2002) ; (ii) un clivage caspase-dépendant de la SMS1 ; (iii) une relocalisation de la SMS1 dans le cytoplasme suite au démantèlement du Golgi qui est un événement précoce dans la signalisation de CD95, déjà décrit dans la littérature (Mukherjee *et al.*, 2007), pouvant moduler la synthèse de SM (Chandran & Machamer, 2008) et qui participerait aux effets intracellulaires du céramide (Hu *et al.*, 2005). L'inhibition *in situ* de l'activité de synthèse de SM, contrairement à l'activité spécifique de l'enzyme, n'est pas totalement contrecarrée par l'utilisation de zVAD-fmk, suggérant qu'une partie des mécanismes mis en jeu dans la cellule ne dépend pas de l'activation des caspases sensibles à cet inhibiteur. Il pourrait ainsi être intéressant de déterminer si les cellules I9-2d présentent une inhibition de l'activité SMS *in situ*.

Il reste également envisageable, qu'en plus des enzymes responsables de la synthèse *de novo* de céramide, de CERT et de l'éventuelle protéine responsable de la translocation des substrats de la SMS vers l'intérieur de l'appareil de Golgi, la SMS possède des protéines cofacteurs enzymatiques au sein du Golgi dont l'expression ou l'activité puisse être régulée par l'induction d'un stress cellulaire. CERT, comme la SMS1, possède des sites putatifs de clivage par les caspases et l'éventuelle protéolyse, ainsi que la fonctionnalité de cette protéine au cours de la signalisation de CD95, sont en cours d'investigation dans notre laboratoire. Il pourrait par ailleurs être intéressant d'identifier la ou les caspases impliquées par interférence à l'ARN. L'apparition de deux formes clivées par Western blot dans ces cellules laisse penser que la SMS1 est au moins clivée à deux sites différents. L'analyse des formes clivées par spectrométrie de masse permettrait de déterminer les sites de clivages préférentiels. L'expression de différents mutants non clivables par les caspases dans des cellules eucaryotes, si ils n'induisent pas de perte de l'activité catalytique dans des conditions basales, pourrait également permettre de déterminer l'importance du clivage de cette enzyme dans la signalisation de CD95. Par ailleurs, la SMS1 possède un domaine SAM (Sterile Alpha Motif) classiquement impliqué dans des interactions protéines-protéines, et pourrait donc interagir avec des protéines pouvant réguler sa fonction. Toutefois, aucune donnée de la littérature n'indique l'existence d'homo-complexes de SMS1 ou 2 et aucun partenaire protéique n'a jusqu'ici été identifié.

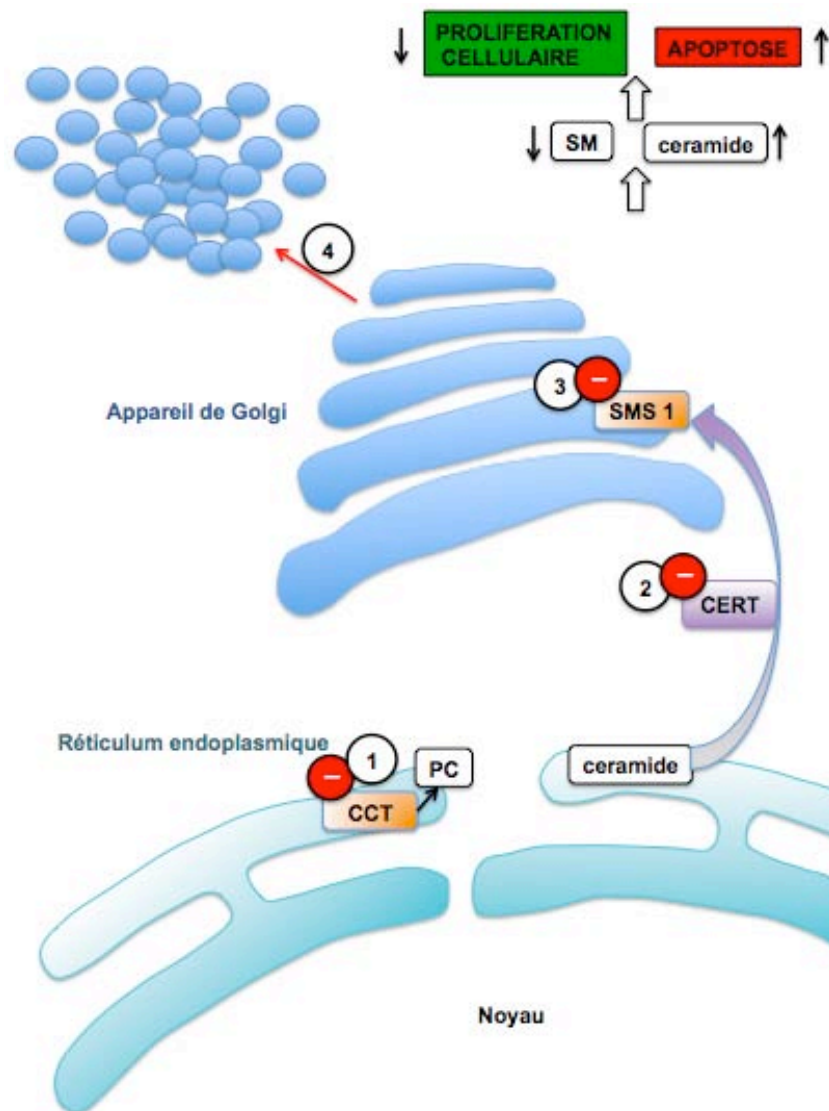


Figure 36 : Mécanismes d'inhibition de l'activité de synthèse de SM par la SMS1 dans la signalisation de CD95. 1. Une inhibition de la synthèse *de novo* de phosphatidylcholine (PC), potentiellement liée à un clivage et à une inhibition caspase-dépendante de la CTP :phosphocholinecytidyltransferase (CCT). 2. Une inhibition du transfert de céramide par CERT du RE vers le Golgi. 3. Une inhibition et un clivage caspase-dépendant de la SMS1. 4. Une fragmentation caspase-dépendante de l'appareil de Golgi.

On estime que 5% du protéome est substrat des caspases (Crawford & Wells, 2010) et il est ainsi envisageable que certains de ces substrats ne soient que des « by-standers » dont le clivage ne modifie pas l'induction de mort cellulaire. Nos résultats indiquent que l'inhibition de l'activité de synthèse de SM a lieu dès 15 minutes, temps auquel aucune modification nucléaire n'est observée. De plus, cette inhibition a également lieu dans des cellules déficientes en caspase 9, qui résistent à l'apoptose induite par CD95L. Ainsi, ces données suggèrent que ce phénomène n'est pas une simple résultante de la mort cellulaire. Nos résultats indiquent également que la modulation de la SMS1 peut influencer l'apoptose induite par TRAIL et CD95L dans différents types de cellules cancéreuses. Ainsi, la surexpression de la SMS1 s'accompagne d'une résistance des cellules cancéreuses vis-à-vis

de ces ligands, tandis que l'inhibition de l'expression de cette enzyme, surexprimée ou endogène, les sensibilise.

L'effet modulateur de la SMS1 sur cette signalisation pourrait s'exercer à plusieurs étapes de la voie apoptotique (Figure 37). Ainsi, nos résultats indiquent que la surexpression de la SMS1 inhibe la formation du DISC. Il serait intéressant d'évaluer les événements membranaires précoces, tels que le clustering des DR, leur regroupement au sein des rafts, ou leur internalisation, afin de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition mis en jeu. Il est par ailleurs envisageable que la fluidité membranaire soit plus largement affectée par des modulations d'expression des SMS, en dehors même de toute stimulation. Il serait également intéressant d'évaluer la localisation des DR par microscopie, en effectuant des co-marquages avec des molécules liant spécifiquement certains sphingolipides, comme la lysénine, qui permet de détecter la SM. Il est à noter que plusieurs études ont au contraire suggéré que la SMS1 jouent un rôle pro-apoptotique dans la signalisation de CD95 (cf. chapitre II.4.4). Dans ces différentes études, la stratégie expérimentale employée était différente, étant donné que les auteurs ont utilisé des cellules totalement déficientes en SM. Ces cellules, qui résistent à l'apoptose dépendante de CD95, ont été transfectées pour exprimer la SMS1. L'expression de la SMS1, non seulement restaure une synthèse de SM, mais permet aussi de sensibiliser les cellules vis-à-vis d'un ligand de CD95. Dans ces cellules totalement déficientes, la déplétion forte en SM pourrait être telle que le pool de SM disponible pour l'hydrolyse en céramide qui favorise le clustering de CD95, soit trop réduit, et que la pré-association de CD95 au sein des radeaux lipidiques soit affectée, phénomènes qui expliqueraient l'altération de la formation du DISC constatée par ces auteurs (Miyaji *et al.*, 2005 ; van Blitterswijk *et al.*, 2010). A l'inverse, les modulations de l'expression de la SMS1 dans les modèles cellulaires que nous avons utilisé restent modérées.

Nos résultats indiquent également que la modulation de l'expression de la SMS1 pourrait réguler le relargage du cytochrome c et l'activation de la caspase 9. En accord avec cette hypothèse, il semblerait que la voie mitochondriale, et surtout l'activation de la caspase 9 qui en découle, soit particulièrement impliquée dans la mort induite par le céramide. Nos données indiquent ainsi que des cellules déficientes en caspase 9 résistent à la mort induite par des doses modérées de C2 et de C16-céramide, bien que le relargage du cytochrome c soit comparable à celui observé dans des cellules contrôles. Ceci minimise donc l'implication potentielle d'autres facteurs relargués par la mitochondrie (tels que AIF ou EndoG) dans ces

conditions et suggère une implication majeure de l'apoptosome. A l'inverse, le traitement de cellules Jurkat avec des doses forte de céramide exogène, conduit à une mort de type nécrotique, indépendante de la caspase 9.

La SMS1 étant une enzyme principalement Golgienne, le pool de céramide directement modulé par cette enzyme est situé au niveau de cet organite. De façon intéressante, la fragmentation de l'appareil de Golgi est un des phénomènes induits par le céramide. Par ailleurs, il a été décrit dans la littérature que, tout comme pour les MAMs du RE, certaines parties de l'appareil de Golgi pouvaient être redistribuées avec des membranes mitochondriales au cours de l'apoptose induite par CD95. Ceci pourrait alors permettre une élévation mitochondriale de céramide qui pourrait exercer un effet direct d'activation du relargage de facteurs mitochondriaux en faveur de la mort cellulaire. Par ailleurs, la génération de céramide par la voie de synthèse *de novo* a également été proposée dans les signalisations induites par CD95L et TRAIL. Il est imaginable que l'accumulation de céramide au niveau de l'appareil de Golgi, qui pourrait avoir lieu dans le cas d'une inhibition de l'activité de synthèse de SM dans la signalisation de CD95, ait un effet inhibiteur sur le transport de céramide du RE vers le Golgi par CERT. De plus, la fragmentation de l'appareil de Golgi diminue la fonction de transport de CERT. Ainsi, on peut imaginer que le céramide néo-synthétisé dans le RE puisse s'accumuler au sein de cet organite et induire, d'une part un stress du RE voire, en se propageant au niveau des MAMS, faciliter une perméabilisation des membranes mitochondriales *via* divers mécanismes. Le céramide pourrait potentiellement activer la voie mitochondriale *via* une action sur des protéines cibles. La fonctionnalité des mitochondries pourrait également être altérée par une modulation de l'expression de la SMS1. Ainsi, le phénotype des souris KO pour la SMS1 est particulièrement intéressant en ce sens puisque ces animaux présentent une altération de la sécrétion d'insuline par les îlots bêta pancréatiques en réponse au glucose, phénomène induit par des dysfonctionnements mitochondriaux qui dépendrait d'une accumulation de ROS (Yano *et al.*, 2010). Par ailleurs, la déficience en CERT est létale au stade embryonnaire et cette létalité est liée à une dilatation du RE et à une dégénération mitochondriale par accumulation de céramide (Wang *et al.*, 2009). Qu'il s'agisse de la signalisation de TRAIL ou de CD95L, nous n'avons pas observé d'effet net de l'inhibition de l'expression de la SMS2 sur l'induction d'apoptose, suggérant ici aussi, que la compartimentalisation et la localisation des lipides joue un rôle important de modulation de leur fonction.

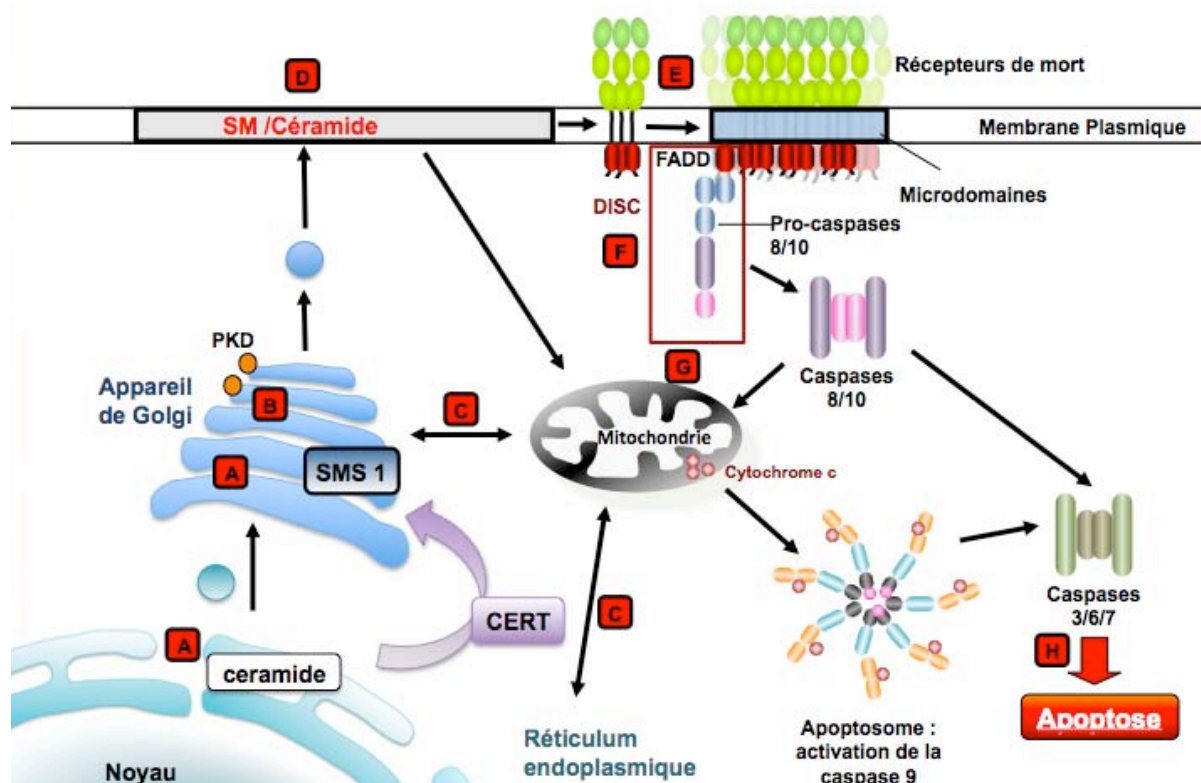


Figure 37: Modulation de la signalisation apoptotique dépendante de CD95 et des TRAILRs par modification de l'activité SMS : mécanismes mis en évidence et hypothèses. A. La modulation de la synthèse *de novo* de céramide au sein du RE, de son transport par CERT et de la synthèse de SM dans l'appareil de Golgi pourraient avoir un impact sur les pools de sphingolipides du RE et de l'appareil de Golgi. B. Ceci pourrait influencer le recrutement de protéines régulatrices de la signalisation des DR, telle que la PKD, au sein de ces organites. C. Des échanges membranaires entre le RE ou l'appareil de Golgi et la mitochondrie pourrait influencer la perméabilisation de cet organite de façon directe. D. La modulation de la synthèse de céramide et/ou de SM pourrait aussi modifier le taux de sphingolipides à la membrane plasmique. E. Une variation des taux de sphingolipides de la membrane plasmique pourrait moduler les événements membranaires de la signalisation des DR (pré-association des DR au sein des radeaux lipidiques, vitesse de regroupement de ces récepteurs suite à la liaison des ligands, internalisation des récepteurs). F. La modulation des événements membranaires influencerait l'intensité et/ou la cinétique de formation du DISC et l'activation des différentes caspases, au moins pour certains types cellulaires. G. De façon dépendante, ou non, de la modulation de la formation du DISC, les événements mitochondriaux (relargage du cytochrome c, d'AIF ou d'Endo G notamment) seraient alors modifiés. A ce titre, l'impact de la modulation de l'expression des membres de la famille de Bcl-2 sur la régulation de la signalisation de mort par l'activité SMS pourrait être évalué. H. Ainsi, la modulation d'une ou plusieurs des étapes citées ci-dessus par l'activité de synthèse de SM expliquerait la régulation de la sensibilité cellulaire à CD95L et à TRAIL.

Il est également important de souligner que la synthèse de SM par les SMS 1 s'accompagne d'une production de DAG. Or, le DAG est un lipide bioactif liant et activant potentiellement des protéines de type PKC. Ainsi, Chiara Luberto et ses collaborateurs ont mis en évidence que l'activité de synthèse de SM induit une élévation de DAG dans le Golgi, qui n'est pas détectable à l'échelle de la cellule entière, ce qui pourrait expliquer notamment pourquoi nous n'avons pas observé de modulation du taux de ce lipide dans nos conditions expérimentales. De plus, ce groupe a mis en évidence que le DAG produit au niveau de l'appareil de Golgi par l'activation de la synthèse de SM

permet le recrutement de la PKD (Protein Kinase D)/PKC μ (Villani *et al.*, 2008). Sachant que la surexpression de la PKD inhibe l'induction d'apoptose induite par CD95L (Trauzold *et al.*, 2003), il est possible que l'inhibition de la synthèse de SM, qui a lieu au cours de l'apoptose induite par CD95, s'accompagne aussi d'une diminution du DAG Golgien, et de l'activation de la PKD, levant ainsi l'inhibition exercée par cette protéine sur la signalisation de CD95. Il serait ainsi intéressant d'évaluer le recrutement de cette protéine à l'appareil de Golgi, ainsi que son niveau d'activation au cours de l'apoptose induite par CD95 dans des cellules surexprimant, ou non, la SMS1. De plus, étant donné que le DAG lui-même peut s'opposer à l'action cytotoxique du céramide (Jarvis *et al.*, 1994), l'inhibition de la synthèse de SM, si elle s'accompagne bel et bien d'une baisse de DAG, pourrait également lever cette inhibition.

Nos données préliminaires suggèrent également qu'il pourrait exister des différences de métabolisme du céramide entre les cellules de type I et de type II, avec des différences de synthèse de SM et peut être de certains gangliosides. Par ailleurs, nos travaux sur les cellules de type I SW480, indiquent qu'elles ne peuvent être rendues résistantes à l'apoptose TRAIL-dépendante par surexpression de la SMS1, contrairement aux deux autres modèles cellulaires HCT 116 et HeLa, de type II. Il serait ainsi intéressant de réaliser une étude de criblage d'un nombre suffisamment important de cellules cancéreuses dont la sensibilité et le type de réponse à CD95/TRAIL sont connues afin d'évaluer leur métabolisme sphingolipidique et d'identifier si il s'agit là de caractéristiques généralisables. Ainsi, une seconde étape pourrait être de moduler l'expression et/ou l'activité des enzymes du métabolisme afin de déterminer si l'on peut modifier le type de réponse et/ou la sensibilité cellulaire à CD95L/TRAIL. Plusieurs groupes ont réalisé des études de criblage afin de mieux définir les cellules de type I et de type II. En 2003, le groupe de Marcus Peter a mis en évidence en testant 58 lignées cancéreuses, que les cellules de type I possédaient plutôt des caractéristiques mésenchymateuses, tandis que les cellules de type II possédaient plutôt des caractéristiques épithéliales, et les auteurs ont alors suggéré que les cellules de type I et de type II représenteraient des étapes différentes de la carcinogénèse (Algeciras-Schimmich *et al.*, 2003). Par ailleurs, une étude indique que le métabolisme des glycosphingolipides pourrait ainsi influencer la transition épithélio-mésenchymateuse. Ainsi, le traitement de plusieurs lignées cellulaires par un inhibiteur de la GCS diminue l'expression d'un marqueur épithélial, augmente celle de marqueurs mésenchymateux et favorise la motilité cellulaire (Guan *et al.*, 2009). A ce titre, il pourrait être intéressant d'évaluer si la transition épithélio-

mésenchymateuse s'accompagne et/ou peut être induite par des modulations de la synthèse de SM.

Nos travaux indiquent que la capacité des cellules à métaboliser le céramide en SM confère également une résistance vis-à-vis de molécules de chimiothérapie anti-cancéreuse. Ainsi, une inhibition modérée de la synthèse de SM pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante pour permettre de sensibiliser les cellules aux agonistes des DR et à la chimiothérapie.

ANNEXES

Liste des abréviations.

ADN (c) : Acide DésoxyriboNucléique (complémentaire)
AICD : Activation-Induced Cell Death
AIF : Apoptosis Inducing-Factor
ALAT : ALanine AminoTransférase
ALPS : Autoimmune LymphoProliferative Syndrome
ANT : Adenine Nucleotide Transporter
Apaf-1 : Apoptotic protease-activating factor-1
APC : AlloPhycoCyanin
Apc : Adenomatous Polyposis Coli
ASAT : ASpartate AminoTransférase
aSMase : Sphingomyélinase acide
ARN (m) : Acide RiboNucléique (messenger)
ATP : Adénosine TriPhosphate
AV : Annexine-V
Bcl-2 : B-cell lymphoma-2
BH : Bcl-2 Homology domain
Bid : Bcl-2 interacting domain
BIR : Baculoviral IAP Repeats
BSA : Bovin Serum Albumin
CAD : Caspase Activated Deoxyribonuclease
CAPP : Ceramide-Activated Protein Phosphatase
CARD : Caspase Recruitment Domain
CCT α : CTP : phosphocholine cytidylyltransférase α
CD : Cluster of Differentiation
CED : Cell Death-abnormal
CERK : Ceramide Kinase
CerS : (dihydro) Céramide synthase
CERT : Ceramide Transfer protein
CMK : Chloro méthyl-cétones
coA : coenzyme A
COG : Conserved Oligomeric Golgi complex
CRD : Cysteine Rich Domain
CRADD : Caspase and RIP Adaptator with Death Domain
CrmA : Cytokine response modifier A
DAG : DiacylGlycerol
DAXX : Death Domain associated protein
DcR : Decoy Receptor
DD : Death Domain
DED : Death Effector Domain
Diablo : Direct IAP Binding protein with LOw pI
DISC : Death Inducing Signaling Complex
DNA-PK : DesoxyriboNucleic Acid-Protein Kinase
DNase I : DésoxyriboNucléase I
DOC : Acide Desoxycholique
DR : Death Receptor
EBV : Epstein-Barr Virus
EDAR : Ectodermal Dysplasia Receptor
EDG : Endothelial Differentiation Gene

EGF : Epidermal Growth Factor
EndoG : Endonucléase G
ESM : Ecart Standard de la Moyenne
FADD : Fas-Associated protein with Death Domain
FAN : Factor Associated with Neutral sphingomyelinase activation
FGF : Fibroblast Growth Factor
FITC : Fluorescein Isothiocyanate
FLICE : FADD-like ICE
FLIP : FLICE Inhibitory Protein
FMK : Fluoro méthyl-cétones
GalCér : Galactosyl Céramide
GalNAc : N-acétylgalactosamine
GCS : Glucosyl Céramide Synthase
GFP : Green Fluorescent Protein
GlcCér : Glucosyl Céramide
gld : generalized lymphoproliferation disease
GPI : Glycosyl Phosphatidyl Inositol
GSL : glycosphingolipides
hiDISC : high molecular weight DISC
HRP : Horse Radish Peroxydase
HtrA2 : High temperature requirement protein A2
IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein
ICAD : Inhibitor of Caspase-Activated DNase
ICE : Interleukin-1 β -Converting Enzyme
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IP : Iodure de Propidium
JNK : cJun N-terminal Kinase
KO : Knock Out
KSR : Kinase Suppressor of Ras
LASS : Longevity ASSurance
LBD : Ligand Binding Domain
LDL : Low Density Lipoproteins
lpr : lymphoproliferation
LPS : lipopolysaccharide
MACs : Mitochondrial Apoptosis-inducing Channels
MAM : Mitochondrial Associated Membranes
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MDR : Multi Drug Resistant
MISC : Motility Inducing Signalling Complex
MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
MMP : Matrix MetalloProteases
MTT : Bromure de 3(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
NCCD : Nomenclature Committee on Cell Death
NF κ B : Nuclear Factor- κ B
NGFR : Nerve Growth Factor Receptor
NK : Natural Killer
OPG : Ostéoprotégérine
PARP : Poly (ADP-Ribose) Polymérase
PBS : Phosphate Buffered Saline
PC : Phosphatidylcholine
PCD : Programmed Cell Death
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PE : Phycoerythrine

PH : Pleckstrin Homology
 PI3K : Phosphatidylinositol-3-Kinase
 PIDD : P53-Induced protein with a Death Domain
 PI-PLC : Phosphatidyl Inositol PhosphoLipase C
 PKC : Protéine Kinase C
 PKD : Protéine Kinase D
 PLAD : Pre-Ligand Assembly Domain
 PLA2 : Phospho Lipase A2
 PMSF : Phenyl Methyl Sulfonyl Fluorure
 PP2A/1: Protéine Phosphatase 2A/1
 PPMP : 1-Phenyl-2-Palmitoylamino-3-Morpholino-1-Propanol
 PRD : Proline Rich Domain
 PS : Phosphatidylsérine
 PTPC : Permeability Transition Pore Complex
 RAIDD : Receptor-interacting protein (RIP)-Associated ICH-1/CED-3 homologous death protein with a Death Domain
 RANK-L : Receptor Activator of NFκB Ligand
 RE : Réticulum Endoplasmique
 RIP : Receptor (TNFSRF)-Interacting Protein
 RNase : Ribonucléase
 ROS : Reactive Oxygen Species
 SA : Acide sialique
 SAM : Sterile Alpha Motif
 SAP : Sphingolipid Activator Protein
 Sa1P : Sphinganine-1-Phosphate
 S1P : Sphingosine-1-Phosphate
 SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency
 SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
 SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
 SIDA : Syndrome d'Immuno Déficience Acquis
 siRNA : small interfering Ribonucleic Acid
 SK : Sphingosine Kinase
 SM : Sphingomyéline
 Smac : Second mitochondrial activator of caspases
 SMase : Sphingomyélinase
 SMS : Sphingomyéline Synthase
 SMSr : Sphingomyéline Synthase related
 SPT : Sérine Palmitoyl Transférase
 SVF : Sérum de Veau Foetal
 t-Bid : truncated Bid
 TBS : Tris Buffered Saline
 TCR : T-Cell Receptor
 TM : domaine transmembranaire
 TNF : Tumor Necrosis Factor
 TNFR-1 : Tumor Necrosis Factor-Receptor-I
 TRADD : TNFR1-Associated *via* Death Domain protein
 TRAF-2 : TNFR-Associated Factor 2
 TRAIL : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
 UV : Ultra-Violets
 VDAC : Voltage Dependent Anion Channel
 VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
 VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
 XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis Proteins
 z-VAD-fmk : Benzyloxycarbonyl Valyl-Alanyl-Aspartyl-(O-methyl)-fluoromethylketone

Liste des publications.

Targeting of T/Tn antigens with a plant lectin to kill human leukemia cells by photochemotherapy. Poiroux, G. Pitié, M. , Culerrier, R. , **Lafont, E.**, Ségui, B., Van Damme, EJM., Peumans, WJ., Bernadou, J, Levade, T, Rougé , P, Barre, A, Benoist, H, *PloS One* (2011)

Regulation of cell death and growth signals at the plasma membrane by sphingomyelin synthesis : implications for hematological malignancies (Revue). **Lafont, E.**, Kitatani, K., Ségui, B., Okazaki, T. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **5** (3), 324-33 (2011)

Caspase-10-dependent-cell death in Fas/CD95 signalling is not abrogated by caspase inhibitor z-VAD-fmk. **Lafont, E.**, Milhas, D., Teissié, J., Therville, N., Andrieu-Abadie, N., Levade, T., Benoist, H., Ségui, B. *PLoS One* **5** (10), e13638 (2010).

Caspase-mediated inhibition of sphingomyelin synthesis is involved in FasL-triggered cell death. **Lafont, E.**, Milhas D., Carpentier, S., Garcia, V., Jin, ZX., Umehara, H., Okazaki, T., Schulze-Othoff, K., Levade, T., Benoist, H., Ségui, B. *Cell Death Differ.* **17**, 642-654 (2010).

The natural marine anhydrophytosphingosine, Jaspine B, induces apoptosis in melanoma cells by interfering with ceramide metabolism. Salma, Y., **Lafont, E.**, Therville, N., Carpentier, S., Bonnafé, M-J., Levade, T., Génisson, Y., Andrieu-Abadie, N. *Biochem. Pharmacol.* **78** (5), 477-485 (2009).

Article de revue : Régulation des signaux de croissance et de mort cellulaires à la membrane plasmique par la synthèse de sphingomyéline : implications dans les cancers hématologiques.

Regulation of Death and Growth Signals at the Plasma Membrane by Sphingomyelin Synthesis: Implications for Hematological Malignancies

Elodie Lafont^{1,2}, Kazuyuki Kitatani³, Toshiro Okazaki⁴ and Bruno Ségui^{1,2}

¹INSERM UMR1037-Cancer Research Center of Toulouse, BP84225, 31432 Toulouse cedex 4, France, ²Université Paul Sabatier (Toulouse III), Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 35 chemin des maraîchers, 31062, Toulouse, France, ³Department of Clinical Laboratory, Medicine/Hematology, Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago, Tottori 683-8504, Japan, ⁴Department of Medicine, Kanazawa Medical University, Uchinada, Ishikawa 920-0293, Japan

Received: ?????????? ??, 2011; Accepted: ?????????? ??, 2011; Revised: ?????????? ??, 2010

Abstract: Resistance to death receptor ligands (such as FasL and TRAIL) and anticancer treatments is a hallmark of cancer cells. Ceramide, a biologically active sphingolipid, antagonizes cell growth and promotes apoptosis and non-apoptotic forms of cell death. The intracellular levels of ceramide are highly regulated *via* complex metabolic pathways. Sphingomyelin synthases (SMS) 1 and 2 convert ceramide to sphingomyelin (SM), a ubiquitous phospholipid in mammals. A growing body of evidence in the literature indicates that SMSs likely modulate hematological cell growth and sensitivity to stress-induced apoptosis. On one hand, complete and sustained inhibition of SMS activity is likely to alter membrane composition and properties through membrane SM depletion, perturbing intracellular signaling pathways and leukemia cell growth and conferring partial resistance to death receptor ligands. On the other hand, different patents & reports point to anti-apoptotic functions for SMSs. In patients with chemoresistant leukemia, a decreased intracellular ceramide level was associated with a higher SMS activity. Thus, SMSs and cofactors may constitute original pharmacological targets to treat leukemia.

Keywords: Cancer, cell death, cell proliferation, ceramide, Sphingolipids, sphingomyelin synthase.

1. INTRODUCTION

Sphingolipids (SLs) are ceramide-derived lipids, present in all human cells, which play a dual role: i) as modulators of membrane function, and ii) as intracellular signal transducers or extracellular messengers. SLs regulate key events, such as cell growth/survival or cell death [1, 2]. Through modifications in the fine membrane structure, cell-cell or cell-matrix interactions, and/or modulation of intracellular signaling pathways, SLs can affect the tumorigenic potential of numerous cell types. Ceramide and its metabolites can modulate the ability of malignant cells to grow and resist anticancer treatments and immune response. Death receptor (DR) ligands (i.e., CD95L, TRAIL and TNF) play a crucial role in anticancer immune surveillance owing to their ability to induce apoptosis in cancer cells. DR-triggered apoptosis is accompanied by alterations of SL metabolism, leading to increased ceramide levels in sensitive but not resistant cancer cells. Restoring ceramide accumulation through modulation of SL metabolism is a promising therapeutical strategy to overcome cancer resistance to anticancer regimens and immune system [3].

1.1. Sphingolipid Metabolism and Diseases

With the exception of sphingosine 1-phosphate (S1P) and some sialic acid-bearing glycosphingolipids (i.e., gangliosides) that are also present extracellularly, most SLs are intracellular and represent key membrane constituents. SL synthesis starts in the endoplasmic reticulum (ER) by several reactions leading to ceramide generation. Ceramide is then transported to the Golgi apparatus *via* CERT (a ceramide transporter protein) to be converted into sphingomyelin (SM), the major sphingophospholipid, within the lumen of the Golgi by SM synthases (SMS) [3, 4]. Alternatively, ceramide is transported through vesicular trafficking from the ER to the Golgi to be either converted to SM or glucosylceramide (GlcCer) by SMS and GlcCer synthase (GCS), respectively [5]. Two different mammalian genes encoding SMS have been cloned so far [6, 7]. The corresponding proteins, SMS1 and SMS2, are both localized at the Golgi, SMS2 being also localized at the plasma membrane [6]. In agreement with Ullman and Radin's early observation in mouse liver [8], both SMS1 and 2 transfer the phosphocholine moiety from phosphatidylcholine to ceramide to generate SM and diacylglycerol (DAG) Fig. (1). SM as well as GlcCer (or its glycosylated derivatives) are in turn transported by vesicular trafficking to the plasma membrane where they concentrate into microdomains, mostly in the outer leaflet. SL catabolism occurs mainly in the lysosomes. For instance, acidic sphingomyelinase (SMase) and acidic β -glucosylceramidase (GlcCerase) hydrolyse lysosomal SM and GlcCer, respectively. SM breakdown also takes place at the plasma membrane by (neutral or acidic) SMases. In addi-

*Address correspondence to these authors at the INSERM UMR1037-Cancer Research Center of Toulouse, BP84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France; Tel: (33)561323531; Fax: (33)561322084; E-mail: bruno.segui@inserm.fr

Department of Medicine, Kanazawa Medical University, Uchinada, Ishikawa 920-0293, Japan; Tel: +81-76-218-8337; Fax: +81-76-286-9290; E-mail: toshiroo@kanazawa-med.ac.jp

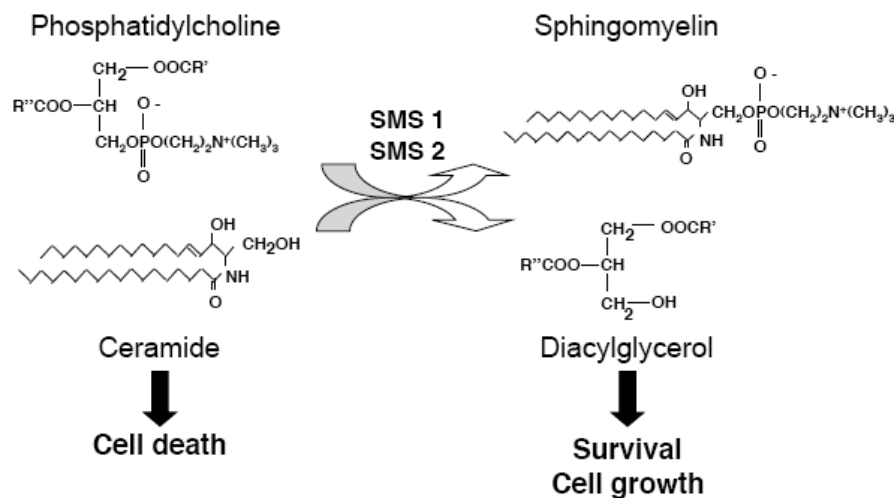


Fig. (1). Enzymatic reaction catalyzed by sphingomyelin synthases: SMS1 and 2 can both transfer the phosphocholine moiety from phosphatidylcholine to ceramide, which is a growth inhibitory and pro-apoptotic sphingolipid. They concomitantly generate sphingomyelin and the pro-survival and cell growth-promoting diacylglycerol (DAG).

tion, GlcCer may be degraded by a non-lysosomal β -glucosidase [3, 4].

The importance of SLs in health and disease is illustrated by the dramatic consequences of inherited disruption of their normal metabolism [9]. Acidic SMase deficiency is responsible for lysosomal SM storage leading to Niemann-Pick disease. Acidic ceramidase deficiency leads to lysosomal ceramide accumulation in cells derived from Farber disease patients. The most frequent SL metabolism disorder is Gaucher disease, which is characterized by GlcCer accumulation within the lysosomal compartment as a consequence of GlcCerase deficiency [9]. Noteworthy, patients affected with Gaucher disease are predisposed to develop cancers, such as multiple myeloma and hepatocellular carcinoma, with 51.1 and 141.3 relative risks, respectively [10].

1.2. Sphingolipids as Modulators of Cancer Cell Death and Progression

Accumulating evidence indicates that some SLs can facilitate cancer development, for instance by inhibiting cancer cell death or, conversely, by enhancing tumorigenesis, tumor neo-angiogenesis and metastatic potential, or by participating to cancer cell escape from the immune system and chemoresistance [11]. Among those SLs, S1P and gangliosides are presently considered to play a major role in tumor biology. For instance, S1P negatively modulates cell death and/or promotes cell proliferation and neoangiogenesis. Also, S1P (and sphingosine kinase over-expression) appears to mediate chemo or radioresistance of solid tumor and leukemia cells [12]. A very recent patent provides siRNAs, which target mRNA encoding sphingosine kinase 1 and potentiate the effect of radiation in the treatment of various cancers [13]. Inventors describe the expression of sphingosine kinase 1 by immunohistochemistry in head and neck squamous cell carcinoma tissue, while the normal tissue does not express this enzyme. Western blotting analysis indicates sphingosine kinase 1 overexpression in primary tumor and lymph node metastases derived from patients affected with

head and neck squamous cell carcinoma as compared to normal tissue. Transfection of siRNA targeting sphingosine kinase 1 in various cancer cell types (i.e., head and neck squamous cell carcinoma cell lines SCC-71 and SCC-15, breast cancer cell line MCF-7, prostate cancer cell line PC-3 and colon cancer cell line HT29) reduced cell viability by 20 to 50% 48 hours post-transfection and inhibited SCC-15 tumor growth in athymic mice. Moreover, siRNA transfected cells were highly sensitized to radiation as compared to control cells both *in vitro* and *in vivo* [13]. Thus, targeting sphingosine kinase 1 is a promising strategy to limit cancer progression and sensitize cancer cells to radiotherapy.

In sharp contrast, ceramide is considered as an anti-proliferative pro-apoptotic SL metabolite for diverse cancer cells derived from solid and hematological malignancies, most likely through its capacity to activate the mitochondrial apoptotic pathway [2, 3, 14]. Accordingly, some exogenous ceramide analogs, which have been covered by patent [15], induce apoptotic and non-apoptotic leukemia cell death that can be inhibited by over-expression of the mitochondrial anti-apoptotic protein Bcl-xL [16]. Moreover, three recent patents provide a method, which associates conventional chemotherapy (i.e., cis-platinum, paclitaxel or gemcitabine) and C6-ceramide for increasing apoptosis in various solid and hematological cancer cells and decreasing tumour progression in mice [17-19].

Failure to generate ceramide in response to chemotherapeutic agents is also a mechanism of resistance that has been reported in various cancer cells [20, 21]. A decreased intracellular ceramide level in chemoresistant leukemia cells has been associated with an altered SL metabolism involving both higher SMS and GCS activities [22]. In addition, the epithelial-mesenchymal transition (EMT), a key process in cancer progression and metastasis [23], has been recently reported to be triggered by pharmacological inhibition of GCS and glycosphingolipid depletion in epithelial cells, including the MCF7 breast carcinoma cell line [24].

1.3. Sphingolipids as Novel Bioactive Molecules in Death Receptor Signaling

DR ligands such as FasL, TNF, and TRAIL all trigger ceramide generation through different mechanisms, including (i) SM breakdown (either by neutral or acidic SMase), (ii) increased *de novo* synthesis, or (iii) inhibition of the SMS-mediated conversion of ceramide to SM [3]. Ceramide and/or its metabolites such as ganglioside GD3 or sphingosine are produced in DR signaling and have been suggested to act as second messengers in cell death induction. They indeed may enhance mitochondrial events such as cytochrome c and AIF release from the mitochondria to the cytosol [3, 25]. An attractive hypothesis is to consider that ceramide production regulates the biochemical and biophysical properties of the plasma membrane, enhancing early DR signaling events such as DR translocation to lipid rafts, DR oligomerization and DISC (Death-Inducing Signaling Complex) formation [26]. According to this concept, ceramide would favor early events in DR signaling at the plasma membrane level rather than acting as an intracellular lipid second messenger *per se* [3, 26, 27].

2. A SMS FAMILY

The activity of SM synthesis was reported to be present in mammals [8, 28]. The intracellular SM level is controlled by both its synthetic and catabolic pathways, and its synthesis is catalyzed only by the action of SMS. In 2004, Okazaki and Holthuis' groups discovered the genes encoding mouse and human SMS Table 1 [6, 7], allowing a better understanding of the physiological functions and regulation of SM synthesis in mammalian cells.

2.1. SM Synthesis

SLs are chemically characterized by the presence of sphingoid bases, and ceramide is a central molecule in SL metabolism. Ceramide serves as a substrate for SMS, which implies that the formation of SM is controlled by the supply of ceramide. There are three major pathways for ceramide formation [14, 29] Fig. (2): i) the *de novo* pathway, ii) the "SM-ceramide" pathway, and iii) the salvage pathway. Those pathways are all connected to SM metabolism.

De novo ceramide synthesis begins with the condensation of L-serine and palmitoyl-CoA, yielding 3-keto-dihydro-

sphingosine. The latter is reduced to dihydrosphingosine that undergoes N-acylation followed by desaturation to eventually generate ceramide. Those reactions occur at the cytosolic leaflet of the ER membrane, and CERT subsequently transfers ceramide to the Golgi apparatus to generate *de novo* SM [30].

Two types of SMase enzymes (acid and neutral SMase) are responsible for the "SM-ceramide" pathway, degrading SM to ceramide that modulates cellular signaling [14]. Conversely, SMS can convert back ceramide generated by SMase activation to SM [31]. The successive SM breakdown to ceramide, as a consequence of SMase activation, and SM (re)synthesis from ceramide, as catalyzed by SMS, has been termed the "SM cycle" [32].

The salvage pathway operates first in the acidic compartments by degrading complex sphingolipids to release sphingoid bases that are further metabolized in the ER to ceramide [29], and this salvaged ceramide can be converted to SM by the catalytic action of SMS.

2.2. Mammalian SMS Genes

Progress in understanding the biological roles of SM synthesis and its regulation has long been hampered by the fact that no successful purification of the responsible enzyme (i.e., SMS) was achieved. In 2003, Luberto *et al.*, for the first time, identified the *Pseudomonas PlcH* as a gene encoding a soluble protein with SMS activity [33]. In 2004, mammalian SMS genes encoding membrane-associated SMS enzymes were cloned [6, 7].

Our group has successfully identified human SMS1 [7]. Methodologically, the SMS molecular cloning began with the isolation of SM-deficient mouse lymphoid cells. Those cells are resistant to cell death induced by the SM-directed cytolytic protein lysenin [7]. Since SM levels play an important role in the retention of cholesterol in the plasma membrane [34], SM-deficient cells are highly sensitive to methyl- β -cyclodextrin, which is capable of inducing cell death by extracting cholesterol from the plasma membrane. SMS1 was cloned by screening a human cDNA library in SM-deficient cells as a suppressor of the toxicity triggered by methyl- β -cyclodextrin [7]. SMS1 expression in the SM-deficient cells restored SM synthesis and sensitivity to lysenin [7]. Consistent with the SMS activity study from

Table 1. A Family of Sphingomyelin Synthases

| | Gene Symbol | AA | Cellular Localization | Enzymatic Products | mRNA Abundance |
|------------|--------------|-----|-----------------------|--------------------|----------------|
| Human SMS1 | <i>SGMS1</i> | 413 | GA | SM | Ubiquitous |
| SMS2 | <i>SGMS2</i> | 365 | PM, GA | SM and CPE | Ubiquitous |
| SMSr | <i>SAMD8</i> | 414 | ER | CPE | |
| Mouse SMS1 | <i>Sgms1</i> | 419 | | SM | |
| SMS2 | <i>Sgms2</i> | 365 | | SM | |
| SMSr | <i>Samd8</i> | 432 | | | |

SMS, sphingomyelin synthase; AA, the number of amino acids; PM, plasma membrane; GA, Golgi apparatus; ER, endoplasmic reticulum; SM, sphingomyelin; CPE, ceramide phosphoethanolamine

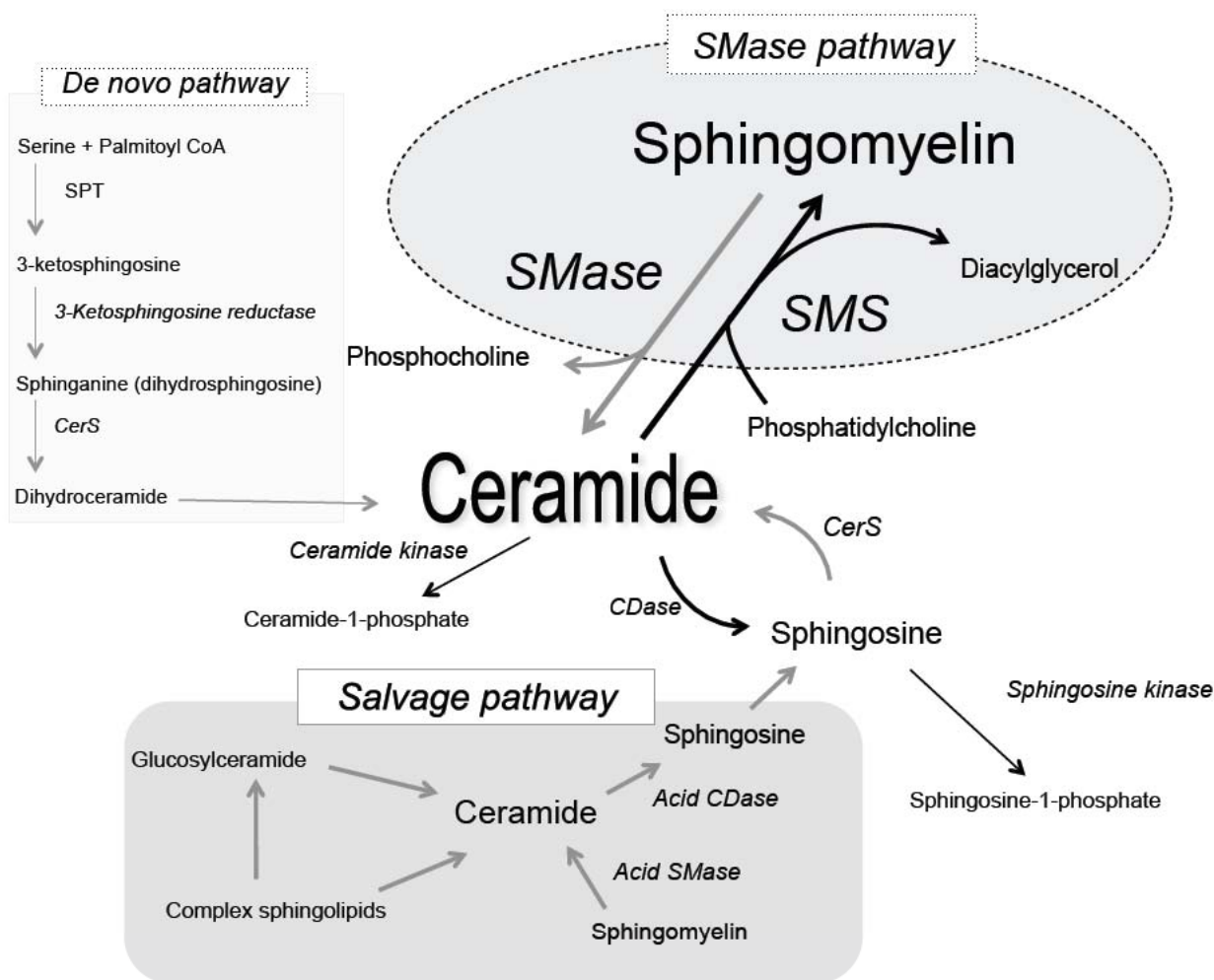


Fig. (2). Ceramide synthesis: The scheme shows metabolic pathways for ceramide synthesis composed of the sphingomyelinase pathway, the de novo pathway, and the salvage pathway. Gray-colored lines indicate the pathway of ceramide synthesis. CDase, ceramidase; CerS, ceramide synthase; SMase, sphingomyelinase; SMS, sphingomyelin synthase; SPT, serine palmitoyltransferase.

Radin and Kennedy's groups [8, 28], SMS1 was able to transfer phosphocholine from phosphatidylcholine to ceramide to generate SM and DAG [6, 7]. The role of SMS1 in SM synthesis in hematological malignant cells was further documented in a Jurkat human T leukemia cell line stably expressing a siRNA targeting SMS1. Indeed, SMS1 knock-down triggered a significant reduction of SM synthesis and SM level and conferred resistance to lysenin-induced toxicity [35].

Holthuis and co-workers identified a family of animal SMS (SMS1, SMS2 and SMSr (SMS related)) using a functional cloning strategy in yeast, an organism lacking SMS activity [6, 31]. Both SMS1 and SMS2, but not SMSr, expression resulted in SM synthesis in yeast [6]. Consistent with the reported enzymatic characterization, SMS1 and SMS2 function as bi-directional lipid choline phosphodiesterases capable of converting phosphatidylcholine and ceramide into SM and DAG, and *vice versa* [6].

Human SMSr possesses homologs in mouse, nematodes and insects like *Drosophila melanogaster*. *Drosophila* does not synthesize SM but produces the SM analog ceramide

phosphoethanolamine (CPE) as a major membrane constituent. Recently, Vacaru *et al.* demonstrated that mammalian SMSr catalyzes the synthesis of this sphingophospholipid in the ER lumen [36]. However, one should note that the CPE intracellular level is very low in mammalian cells, as analysed by mass spectrometry [36]. Another recent study demonstrated that SMS2 can synthesize CPE, indicating that SMS2 has a dual enzyme activity [37].

The nuclear fraction isolated from human leukemia cells has been shown to contain SMS activity [38]. SMS activities were also found in rat liver nuclear membrane and chromatin [39]. Whether or not SMS1 and/or SMS2 are responsible for nuclear SM synthesis remains currently unknown. Because SMS1 is Golgi-localized and SMS2 is mainly located at the plasma membrane [6], it is tempting to speculate that unidentified gene(s) may encode a SMS that specifically synthesizes SM in the nucleus.

2.3. Structure of Animal SMSs

SMS family members were predicted to have distinct domains such as a N-terminal sterile α motif (SAM) domain and multiple transmembrane (TM) domains Fig. (3) [6].

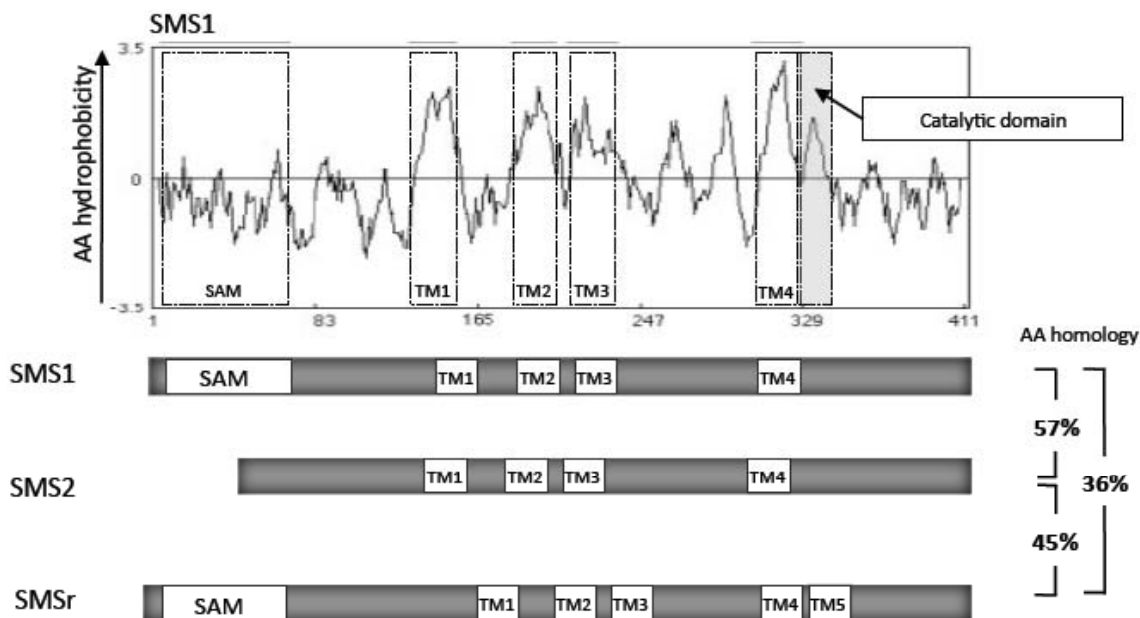


Fig. (3). Structure and hydropathy plot of amino acid sequence in human SMS family: AA, amino acids; SAM, sterile alpha motif (SAM) domain; TM, candidate for transmembrane domain.

Both SMS1 and SMSr, but not SMS2, possess a SAM domain at the N-terminus part Fig. (3). SAM domains are known to be involved in diverse protein–protein interactions [40]. However, no SMS-interacting proteins have been identified so far. Deletion of the SAM domain in SMSr triggered its redistribution from the ER to the Golgi without affecting its enzymatic activity [36]. Neither truncation of SMS1 SAM domain nor addition of the SAM domain to the N-terminus of SMS2 had any effect on their localization and catalytic activities [41]. Thus, the function of SMS SAM domain remains unclear.

Both SMS1 and SMS2 contain two histidine and one aspartic acid residues, which are evolutionally conserved within the lipid phosphatase superfamily [6] and account for SMS activity [41]. SMS1 and 2 catalytic domains are located in the lumen of the Golgi [6], where most of SM synthesis takes place. Palmitoylation at the COOH-terminal tail of SMS2 accounts for its localization at the plasma membrane [42], where SMS2 catalytic domain is exposed at the cell surface, possibly allowing SM synthesis in the outer leaflet of the plasma membrane [6].

3. SMS IN CELL GROWTH/SURVIVAL

Several lines of evidence indicate that SMS activity behaves as a critical factor for cell growth and survival.

3.1. Role for SMSs in Cell Proliferation

Up-regulation of SMS activity has been reported to be associated with enhanced proliferation induced by hepatic regeneration [43], SV40-transformation [44] and bFGF [45]. So far, the mechanisms that promote SMS-dependent cell growth remain poorly understood. By limiting ceramide accumulation and increasing DAG levels, SMS activity likely enhances cell proliferation [46]. Using a fluorescently labelled conventional C1 domain (from protein kinase C

(PKC)) for probing cellular DAG *in vivo*, Villani *et al.* demonstrated that SMS1 and SMS2 could substantially modulate subcellular pools of DAG [47]. Tafesse *et al.* have shown that both SMS1 and SMS2 positively modulate human HeLa carcinoma cell growth [46]. As a matter of fact, SMS1 or 2 knockdown in HeLa cells was accompanied by a decreased SM and an increased ceramide intracellular levels and by subsequent cell growth inhibition [46]. Moreover, SM-deficient WR19L mouse lymphoid leukemia did not grow in serum-free medium, which does not contain exogenous SM [7]. Expression of SMS1 not only restored SM synthesis but also cell growth under serum starvation conditions. Of a particular interest was the finding that addition of exogenous SM also restored SM-deficient WR19L cell growth, indicating that SM is an important constituent of cell membranes for optimal cell proliferation [7]. Jin *et al.* have recently reported that SMS1 knockdown in Jurkat cells severely impaired T-cell receptor (TCR) signaling, reducing LAT (Linker for activation of T cells)-dependent signaling complex formation in plasma membrane microdomains [35]. Thus, membrane SM appears to be critical for TCR signaling, leading to T cell proliferation and activation.

3.2. Regulation of SMS Activity in the Survival of Hematopoietic Cells

Interleukin-2 (IL-2) is a key cytokine for the clonal expansion and functional differentiation in natural killer (NK) cells. Human KHYG-1 NK cells require IL-2 for cell growth and survival. Experimentally, IL-2 deprivation from cell culture medium caused reduction of SMS activity, generation of ceramide and subsequent cell death [48]. Considering the function of ceramide as a pro-apoptotic molecule, inhibition of ceramide conversion to SM by down-regulation of SMS activity may favor ceramide accumulation and ceramide-dependent cell death. Thus, SMS activation in response

to IL-2 likely limits ceramide accumulation and participates to the pro-survival effects triggered by IL-2 in NK cells [48].

3.3. SMS Activity and Drug-resistance in Hematopoietic Malignant Cells

Ceramide serves as a substrate for SMS and GCS, forming SM and GlcCer, respectively. The latter has been implicated in drug resistance because GCS up-regulation promotes the conversion of ceramide to GlcCer and blocks ceramide accumulation [49]. Drug-resistant HL-60/ADR cells have been established from human leukemic HL-60 cells, and doxorubicin treatment increased the ceramide levels and apoptosis in drug-sensitive HL-60 cells but not drug-resistant HL-60/ADR cells [22]. HL-60/ADR cells displayed an up-regulation of SMS and GCS activities as compared with the parental cells. Consistently, those enzyme activities were also up-regulated and ceramide was decreased in leukemic cells from chemoresistant patients. Those results might imply that the coordination of ceramide consumption by those enzymes is involved in chemoresistance of leukemia.

Recently, Swanton *et al.* identified CERT gene influencing sensitivity of different cancer cell types to chemotherapeutic agents, and showed that CERT expression is increased in drug-resistant cell lines [50]. As CERT delivers ceramide to the sites of SMS activity, CERT up-regulation might increase the availability of ceramide for SM synthesis and eventually suppress ceramide accumulation that leads to cell death. This CERT-SMS cooperation may influence the sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents. Taken together, inhibiting SMS and/or GCS activation may represent an interesting strategy to sensitize leukemic cells to chemotherapy.

4. SM SYNTHESIS IN STRESS-INDUCED APOPTOSIS

SM is the most abundant SL in human cell (plasma) membranes [51, 52]. SM synthesis is known to modulate apoptosis, and may represent a pivotal element in tuning the response of cancer cells to insults such as DR ligands and chemotherapeutics. First, a growing body of evidence indicates that inhibition of SM synthesis may be responsible, at least in part, for stress-induced ceramide increase. Second, as a substrate for SMases, SM constitutes a main source of ceramide production in stress-induced apoptosis. Third, SM is a key microdomain component and may therefore regulate biophysical and biochemical plasma membrane properties, modulating stress-induced proximal apoptotic signaling events [3, 52, 53].

4.1. Inhibition of SM Synthesis in Stress-induced Apoptosis

Various stress stimuli, including FasL (or agonistic anti-Fas antibody), TNF, staurosporine, UVB and photodynamic therapy, inhibit SM synthesis [38, 53-57]. For instance, CD95/Fas engagement is accompanied by (i) the activation of a neutral SMase activity, (ii) the inhibition of a SMS activity, and (iii) ceramide increase within the nucleus in Jurkat leukemia T cells [38]. All these events occurred in a caspase-dependent manner since they were prevented by the caspase

inhibitor DEVD-cmk [38]. Thus, together with SMase activation, the inhibition of SMS activity likely enhances ceramide production in Fas signaling. More recently, we provided evidence that FasL-induced apoptosis is accompanied by caspase-dependent cleavage and inhibition of SMS1, which is the most expressed isoform in Jurkat leukemic cells [53]. Furthermore, we demonstrated that SMS1 is a novel caspase substrate, which was cleaved in a cell free system by various caspases including caspase-2, -7, -8 and -9, but not caspase-3 and -10. FasL-triggered SMS1 cleavage and inhibition were abolished by zVAD-fmk, a broad-spectrum caspase inhibitor [53]. *In vitro*, SMS specific activity, as measured in protein extracts derived from Jurkat cells, was decreased in a time- (as early as 15 min) and caspase-dependent manner in Fas signaling [53], further indicating that SMS1 is directly cleaved and inactivated by caspases Fig. (4).

Caspase-dependent cleavage of SMS1 is unlikely to be the only mechanism that accounts for the inhibition of SM synthesis in Fas signaling. Indeed, Golgi dismantling rapidly occurs after Fas ligation [58]. Golgi fragmentation may be responsible for the alteration of specific catalytic activity of Golgi-located enzymes. Accordingly, we have shown that SMS1, which is Golgi-localized in untreated cells, relocates throughout the cytoplasm upon FasL treatment [53]. Moreover, one can speculate that Golgi alteration and consequently, SMS1 relocation, may decrease SMS substrates (i.e., ceramide and PC) delivery and accessibility and, in turn, could reduce SM synthesis. In addition, stress-induced apoptosis is associated with caspase-dependent cleavage and inhibition of CTP:phosphocholine cytidyltransferase (CCT), the rate-limiting enzyme of *de novo* PC synthesis [59]. Hence, CCT inhibition results in the decrease of synthesis of PC, a direct substrate of SMS and thus, likely impairs *de novo* SM synthesis [3]. Indeed, we observed that *de novo* PC synthesis was significantly reduced in Fas signaling [53]. The other substrate of SMS is ceramide. Whereas stress-induced apoptosis triggers *de novo* ceramide synthesis, the transport of ceramide from the ER to the Golgi may be impaired as a consequence of the inhibition of CERT activity [3] and/or vesicular trafficking [5]. Interestingly, inhibition of SM synthesis in response to UVB was associated with the homotrimerization of CERT, indicating that the alteration of CERT-dependent ceramide trafficking may constitute an alternative mechanism for SM synthesis inhibition [57] Fig. (4).

4.2. Does SMS Inhibition Modulate Apoptotic Signaling?

To evaluate whether SMS inhibition may be a causal event in stress-induced ceramide generation and apoptosis rather than a mere consequence of cell death, SMS activity and expression in malignant cells were inhibited by pharmacological and silencing strategies, respectively.

Jaspine B, a phytosphingosine derived from marine sponge, which displayed toxicity towards various cancer cells [60], has been recently reported to trigger SM synthesis inhibition, ceramide increase and cell death in melanoma cells [61]. In addition, the CERT inhibitor N-(3-hydroxy-1-hydroxymethyl-3-phenylpropyl)alkaneamide 12 (HPA-12), which impairs SM synthesis [62, 63], restored paclitaxel-

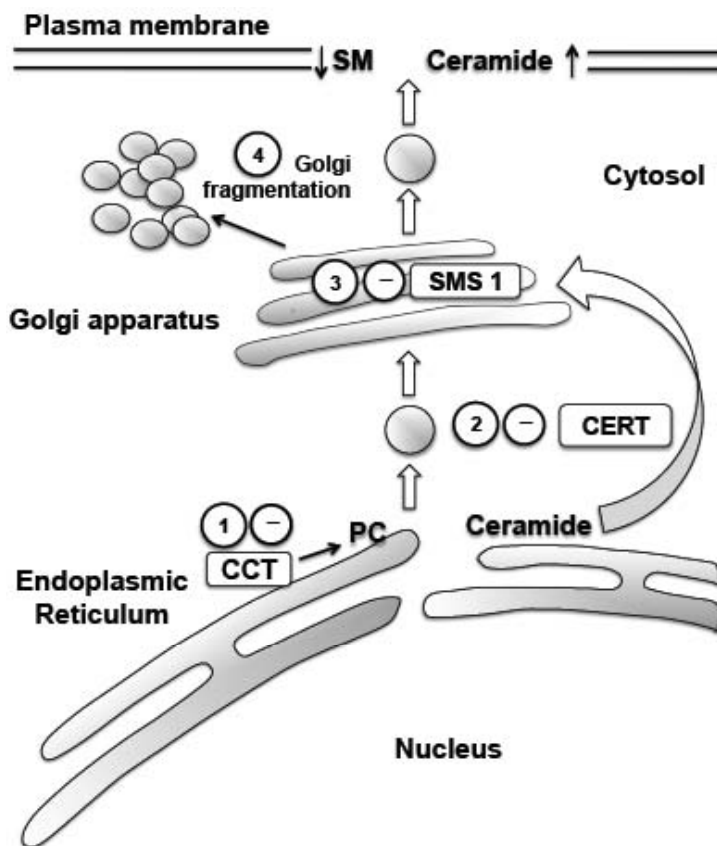


Fig. (4). Different ways to inhibit *de novo* SM synthesis: (1) the inhibition of *de novo* PC synthesis, as a consequence of caspase-dependent CTP:phosphocholine cytidyltransferase (CCT) cleavage and inhibition, (2) the inhibition of vesicular- or CERT-dependent ceramide transfer from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, (3) the caspase-dependent SMS1 cleavage and inhibition, (4) the caspase-dependent Golgi apparatus fragmentation.

induced cell death in resistant ovarian cancer cells [50]. Thus, pharmacological inhibition of SM synthesis in cancer cells may trigger apoptosis and/or sensitize cells to chemotherapy, most likely by perturbing the ceramide-SM equilibrium.

D609 is a compound that has been widely used as an inhibitor of phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) and, indirectly, acidic sphingomyelinase (SMase). For instance, D609 impairs TNF- and anti-Fas-induced activation of a PC-PLC (that still awaits molecular identification) and acidic SMase [64-67]. In this context, PC-PLC stimulation leads to the rise of DAG, which enhances acidic SMase activity and hence ceramide levels [64, 65]. More recently, D609 has been shown to inhibit SMS [6, 38, 44]. Noteworthy, D609 and derivatives, which inhibit SMS activity and display cytotoxicity towards cancer cells, including leukemic cells, have been recently patented [68].

D609 has been reported to modulate cell death signaling initiated by death receptors. D609 can prevent TNF-induced cytotoxicity in various cell types both *in vitro* and *in vivo* [67, 69]. However, D609 has been shown to sensitize U937 leukemic cells to TNF and an agonistic anti-Fas antibody [70]. Controversy exists as to the effect of D609 in Fas signaling. D609 inhibits a nuclear SMS activity and enhances Fas cross-linking-induced ceramide production and cell death in Jurkat cells [38]. More recently, it has been published that D609 impaired HeLa cell death in response to an

agonistic anti-Fas antibody whereas it had no effect in SKW6.4 cells [71]. Thus, one can speculate that the ability of D609 to modulate death receptor-induced cell death is cell type-dependent. However, it should be noted that opposite findings were reported using the same cell type, i.e., Jurkat cells, in response to Fas engagement [38, 71]. Thus, further studies are needed to elucidate the mode of action of this compound.

The conflicting findings observed using D609 might be related to the lack of specificity of this inhibitor. Based on an epigenetic strategy, we have recently reported that, in Jurkat cells, the inhibition of SMS1 expression by RNA interference triggered 40% SMS activity reduction and significantly enhanced FasL-triggered ceramide generation, caspase cascade activation and apoptosis [53]. Conversely, FasL neither increased ceramide levels nor efficiently induced cell death in SMS1-overexpressing HeLa cells, exhibiting 150% SMS activity increase. Finally, SMS1 knockdown not only sensitized HeLa cells to FasL but also overcame the resistance conferred by SMS1 overexpression. Moreover, SMS2, which is expressed in HeLa cells, may also negatively regulate FasL-induced apoptosis, albeit to a lesser extent as compared to SMS1 [53]. Thus, our findings argue for an anti-apoptotic function of SMS enzymes in Fas signaling.

The anti-apoptotic function of SMS is unlikely restricted to Fas signaling. Indeed, different studies indicate that SMS inhibits apoptosis under various stress conditions. In *S. cere-*

visiae, which do not express endogenous SMS, expression of mouse SMS1 suppressed the growth-inhibitory effect of Bax and other cytotoxic stimuli including hydrogen peroxide, heat shock, osmotic stress and exogenous ceramide [72]. In Jurkat cells, whereas SMS1 or SMS2 knockdown sensitized cells to phototherapy-induced cell death, SMS1 overexpression was protective [55, 56]. Finally, SMS1 overexpression inhibits staurosporine-triggered apoptosis in oligodendroglioma cells [73]. Thus, under various stress conditions, SMSs behave as anti-apoptotic enzymes, likely through their ability to metabolize the pro-apoptotic ceramide into non-apoptotic (inert) SM. Alternatively, SMS activity may increase the Golgi level of DAG [47], thereby inhibiting stress-induced apoptosis *via* recruitment and activation of DAG-binding protein, such as PKC.

Other reports, however, may indicate a pro-apoptotic function of SMS. A S49 mouse lymphoma cell line, which was completely deficient for SMS1 expression and SMS activity, resisted alkyl-lysoPC (edelfosine)-induced cell death [74]. SMS1-knockdown in parental S49 cells triggered SM deficiency and conferred resistance to edelfosine. In this study, it was concluded that SMS1 downregulation impairs lipid raft composition, and, in turn, inhibits edelfosine uptake [74]. Of note, different patents covered the use of various exogenous SLs, including SM analogs, for increasing chemotherapeutic drug delivery and/or cytotoxicity effect in cancer cells [15, 75, 76]. Moreover, it has been reported that edelfosine-resistant S49 cells display decreased Fas expression and resist FasL-induced apoptosis [77]. Interestingly, addition of exogenous short-chain SM partially restored Fas expression into microdomains and FasL sensitivity. Thus, SM, which is enriched in plasma membrane microdomains, likely stabilizes Fas expression at the cell surface, facilitating FasL-induced cell death [77]. In another SM-deficient murine leukemia cell line (WR19L), CD95 relocation into microdomains, DISC formation and apoptosis were significantly impaired upon treatment with an agonistic anti-CD95 antibody [78]. Overexpression of SMS1 restored DISC formation, full caspase activation and cell death in SM-deficient WR19L cells upon CD95 engagement [78]. In addition, SMS1 expression in SM-deficient WR19L cells significantly enhanced DISC formation and cell death in response to cisplatin combined to anti-Fas antibody [79]. These results seem at odds with our recent observations in HeLa and Jurkat cells, in which SMS1 knockdown enhanced FasL-induced apoptosis [53]. However, one should note that, under our experimental conditions, SM level was minimally affected by SMS1 knockdown. Thus, partial SMS1 inhibition does not drastically impair SM content and significantly enhanced FasL-induced cell death most likely by limiting ceramide conversion to SM. In sharp contrast, membrane SM depletion, as a consequence of complete and sustained inhibition of SMS activity, may alter microdomain composition and properties and impair proximal events in CD95 signaling such as DISC formation, thereby conferring partial resistance to CD95 agonists [3].

In addition, TNF-triggered pro-apoptotic and pro-inflammatory cell signaling is likely modulated by SM synthesis. Whereas overexpression of SMS1 or 2 in Chinese hamster ovarian cells enhanced apoptosis in response to TNF [80], SMS2 knockdown in HEK293 cells decreased by 50%

de novo SM synthesis and impaired TNF-triggered recruitment of TNF-R1 to lipid rafts, TNF-R1 internalization and NF- κ B activation [81]. The same group reported that SMS1 or 2 knockdown in THP1-derived macrophages reduced intracellular SM level by 20% and sensitivity to lipopolysaccharide (LPS)-mediated apoptosis [80]. Finally, LPS-triggered NF- κ B activation was altered in macrophages derived from SMS2-knockout mice, which displayed reduced *de novo* SM synthesis [81]. SMS silencing or deficiency resulted in the impairment of membrane recruitment of TLR4 signaling complexes, altering LPS signaling in macrophages [80, 81]. Thus, the two latter studies further support the notion that plasma membrane SM is important to modulate proximal events in cell signaling, enabling formation of macromolecular signaling complexes upstream of cascade pathway activation.

5. CURRENT & FUTURE DEVELOPMENTS:

Different studies demonstrate that SM synthesis is important for cell growth. First, cell growth is significantly reduced in SM-deficient cells, including in leukemia cells [7]. Second, SMS1 or SMS2 knockdown slows down cell growth in HeLa cells [46]. Third, two different reports indicate that SM synthesis is likely increased in chemoresistant cancer cells. SMS activity, along with GCS activity, was higher in chemoresistant leukemia cells as compared to chemosensitive cells. Accordingly, ceramide levels were lower in chemoresistant cells, indicating that ceramide is metabolized into complex sphingolipids (i.e., SM and glycosphingolipids) [22]. In addition, the expression of CERT, which is required for efficient SM synthesis, was increased in paclitaxel-resistant cell lines and ovarian tumors [50]. Interestingly, CERT knockdown significantly sensitized cancer cells to multiple anticancer drugs [50]. Thus, inhibiting SM synthesis through blockade of CERT-dependent ceramide trafficking or SMS activity, may constitute an interesting strategy to increase intracellular levels of ceramide and sensitize cancer cells to chemotherapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Drs. T. Levade and H. Benoist for critical reading of the manuscript. This study has been funded by Paul Sabatier University and INSERM (to EL and BS) and was supported in part by the Sapporo Biocluster "Bio-S", the Knowledge Cluster Initiative of the Ministry of Education, Sports, Science and Technology (Japan), and the Japan Society for the Promotion of Science (Grant-in-Aid for Young Scientists Start-up 21890144 to K.K.).

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Hannun YA, Obeid LM. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* 2002; 277(29): 25847-50.
- [2] Hannun YA. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 1996; 274(5294): 1855-9.
- [3] Segui B, Andrieu-Abadie N, Jaffrezou JP, Benoist H, Levade T. Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential

- therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758(12): 2104-20.
- [4] Futerman AH, Hannun YA. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep* 2004; 5(8): 777-82.
- [5] Giussani P, Colleoni T, Brioschi L, Bassi R, Hanada K, Tettamanti G, *et al.* Ceramide traffic in C6 glioma cells: Evidence for CERT-dependent and independent transport from ER to the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta* 2008;1781(1-2):40-51.
- [6] Huitema K, van den Dikkenberg J, Brouwers JF, Holthuis JC. Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *Embo J* 2004; 23(1): 33-44.
- [7] Yamaoka S, Miyaji M, Kitano T, Umehara H, Okazaki T. Expression cloning of a human cDNA restoring sphingomyelin synthesis and cell growth in sphingomyelin synthase-defective lymphoid cells. *J Biol Chem* 2004; 279(18): 18688-93.
- [8] Ullman MD, Radin NS. The enzymatic formation of sphingomyelin from ceramide and lecithin in mouse liver. *J Biol Chem* 1974; 249(5): 1506-12.
- [9] Sabourdy F, Kedjouar B, Sorli SC, Colie S, Milhas D, Salma Y, *et al.* Functions of sphingolipid metabolism in mammals-lessons from genetic defects. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1781(4): 145-83.
- [10] de Fost M, Vom Dahl S, Weverling GJ, Brill N, Brett S, Haussinger D, *et al.* Increased incidence of cancer in adult Gaucher disease in Western Europe. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36(1): 53-8.
- [11] Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(8): 604-16.
- [12] Pyne NJ, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(7): 489-503.
- [13] Uttam, S.K., Rizwan, M. Compositions and methods of sphingosine kinase inhibitors in radiation therapy of various cancers. US20100331393 (2010).
- [14] Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):139-50.
- [15] Dagan, A., Gatt, S. Sphingolipids. US6756504 (2004).
- [16] Granot T, Milhas D, Carpentier S, Dagan A, Segui B, Gatt S, *et al.* Caspase-dependent and -independent cell death of Jurkat human leukemia cells induced by novel synthetic ceramide analogs. *Leukemia* 2006; 20(3): 392-9.
- [17] Wanebo, H.J., Mehta, S. Combinations of ceramide and chemotherapeutic agents for inducing tumor cell death. US7015251 (2006).
- [18] Wanebo, H.J. Combination of ceramide and gemcitabine for inducing cell death and uses thereof in treating cancer. US20090246271 (2009).
- [19] Wanebo, H.J., Mehta, S. Combinations of ceramide and chemotherapeutic agents for inducing cell death and uses thereof in treating cancer. US7820718 (2010).
- [20] Kolesnick R. The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest* 2002; 110(1): 3-8.
- [21] Saddoughi SA, Song P, Ogretmen B. Roles of bioactive sphingolipids in cancer biology and therapeutics. *Subcell Biochem* 2008; 49: 413-40.
- [22] Itoh M, Kitano T, Watanabe M, Kondo T, Yabu T, Taguchi Y, *et al.* Possible role of ceramide as an indicator of chemoresistance: Decrease of the ceramide content via activation of glucosylceramide synthase and sphingomyelin synthase in chemoresistant leukemia. *Clin Cancer Res* 2003; 9(1): 415-23.
- [23] Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, *et al.* Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 2007; 213(2): 374-83.
- [24] Guan F, Handa K, Hakomori SI. Specific glycosphingolipids mediate epithelial-to-mesenchymal transition of human and mouse epithelial cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(18): 7461-6.
- [25] Siskind LJ. Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J Bioenerg Biomembr.* 2005;37(3):143-53.
- [26] van Blitterswijk WJ, van der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M, Borst J. Ceramide: Second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem J* 2003; 369(Pt 2): 199-211.
- [27] Segui B, Legembre P. Redistribution of CD95 into the lipid rafts to treat cancer cells? *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2010; 5(1): 22-8.
- [28] Voelker DR, Kennedy EP. Cellular and enzymic synthesis of sphingomyelin. *Biochemistry* 1982; 21(11): 2753-9.
- [29] Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal* 2008; 20(6): 1010-8.
- [30] Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, *et al.* Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 2003; 426(6968): 803-9.
- [31] Tafesse FG, Ternes P, Holthuis JC. The multigenic sphingomyelin synthase family. *J Biol Chem* 2006; 281(40): 29421-5.
- [32] Hannun YA. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem* 1994; 269(5): 3125-8.
- [33] Luberto C, Stonehouse MJ, Collins EA, Marchesini N, El-Bawab S, Vasil AI, *et al.* Purification, characterization, and identification of a sphingomyelin synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. PlcH is a multifunctional enzyme. *J Biol Chem* 2003; 278(35): 32733-43.
- [34] Fukasawa M, Nishijima M, Itabe H, Takano T, Hanada K. Reduction of sphingomyelin level without accumulation of ceramide in Chinese hamster ovary cells affects detergent-resistant membrane domains and enhances cellular cholesterol efflux to methyl-beta-cyclodextrin. *J Biol Chem* 2000; 275(44): 34028-34.
- [35] Jin ZX, Huang CR, Dong L, Goda S, Kawanami T, Sawaki T, *et al.* Impaired TCR signaling through dysfunction of lipid rafts in sphingomyelin synthase 1 (SMS1)-knockdown T cells. *Int Immunol* 2008; 20(11): 1427-37.
- [36] Vacaru AM, Tafesse FG, Ternes P, Kondylis V, Hermansson M, Brouwers JF, *et al.* Sphingomyelin synthase-related protein SMSr controls ceramide homeostasis in the ER. *J Cell Biol* 2009; 185(6): 1013-27.
- [37] Ternes P, Brouwers JF, van den Dikkenberg J, Holthuis JC. Sphingomyelin synthase SMS2 displays dual activity as ceramide phosphoethanolamine synthase. *J Lipid Res* 2009; 50(11): 2270-7.
- [38] Watanabe M, Kitano T, Kondo T, Yabu T, Taguchi Y, Tashima M, *et al.* Increase of nuclear ceramide through caspase-3-dependent regulation of the "sphingomyelin cycle" in Fas-induced apoptosis. *Cancer Res* 2004; 64(3): 1000-7.
- [39] Albi E, Magni MV. Sphingomyelin synthase in rat liver nuclear membrane and chromatin. *FEBS Lett* 1999; 460(2): 369-72.
- [40] Kim CA, Bowie JU. SAM domains: Uniform structure, diversity of function. *Trends Biochem Sci* 2003; 28(12): 625-8.
- [41] Yeang C, Varshney S, Wang R, Zhang Y, Ye D, Jiang XC. The domain responsible for sphingomyelin synthase (SMS) activity. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1781(10): 610-7.
- [42] Tani M, Kuge O. Sphingomyelin synthase 2 is palmitoylated at the COOH-terminal tail, which is involved in its localization in plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381(3): 328-32.
- [43] Miro-Obradors MJ, Osada J, Aylagas H, Sanchez-Vegazo I, Palacios-Alaiz E. Microsomal sphingomyelin accumulation in thioacetamide-injured regenerating rat liver: Involvement of sphingomyelin synthase activity. *Carcinogenesis* 1993; 14(5): 941-6.
- [44] Luberto C, Hannun YA. Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation. Does sphingomyelin synthase account for the putative phosphatidylcholine-specific phospholipase C? *J Biol Chem* 1998; 273(23): 14550-9.
- [45] Riboni L, Viani P, Bassi R, Giussani P, Tettamanti G. Basic fibroblast growth factor-induced proliferation of primary astrocytes: evidence for the involvement of sphingomyelin biosynthesis. *J Biol Chem* 2001; 276(16): 12797-804.
- [46] Tafesse FG, Huitema K, Hermansson M, van der Poel S, van den Dikkenberg J, Uphoff A, *et al.* Both sphingomyelin synthases SMS1 and SMS2 are required for sphingomyelin homeostasis and growth in human HeLa cells. *J Biol Chem* 2007; 282(24): 17537-47.
- [47] Villani M, Subathra M, Im YB, Choi Y, Signorelli P, Del Poeta M, *et al.* Sphingomyelin synthases regulate production of diacylglycerol at the Golgi. *Biochem J* 2008; 414(1): 31-41.
- [48] Taguchi Y, Kondo T, Watanabe M, Miyaji M, Umehara H, Kozutsumi Y, *et al.* Interleukin-2-induced survival of natural killer (NK) cells involving phosphatidylinositol-3 kinase-dependent reduction of ceramide through acid sphingomyelinase, sphingomyelin synthase, and glucosylceramide synthase. *Blood* 2004; 104(10): 3285-93.

- [49] Gouaze-Andersson V, Cabot MC. Glycosphingolipids and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758(12): 2096-103.
- [50] Swanton C, Marani M, Pardo O, Warne PH, Kelly G, Sahai E, et al. Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapeutic drugs. *Cancer Cell* 2007; 11(6): 498-512.
- [51] Merrill AH, Jr., Jones DD. An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1044(1): 1-12.
- [52] Milhas D, Clarke CJ, Hannun YA. Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: Implications for bioactive sphingolipids. *FEBS Lett* 2009; 584(9): 1887-94.
- [53] Lafont E, Milhas D, Carpentier S, Garcia V, Jin ZX, Umehara H, et al. Caspase-mediated inhibition of sphingomyelin synthesis is involved in FasL-triggered cell death. *Cell Death Differ* 2010; 17(4): 642-54.
- [54] Bourtelee S, Hausser A, Doppler H, Horn-Muller J, Ropke C, Schwarzmann G, et al. Tumor necrosis factor induces ceramide oscillations and negatively controls sphingolipid syntheses by caspases in apoptotic Kym-1 cells. *J Biol Chem* 1998; 273(47): 31245-51.
- [55] Separovic D, Hanada K, Maitah MY, Nagy B, Hang I, Tainsky MA, et al. Sphingomyelin synthase 1 suppresses ceramide production and apoptosis post-photodamage. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358(1): 196-202.
- [56] Separovic D, Semaan L, Tarca AL, Awad Maitah MY, Hanada K, Bielawski J, et al. Suppression of sphingomyelin synthase 1 by small interference RNA is associated with enhanced ceramide production and apoptosis after photodamage. *Exp Cell Res* 2008; 314(8): 1860-8.
- [57] Charruyer A, Bell SM, Kawano M, Douangpanya S, Yen TY, Macher BA, et al. Decreased Ceramide Transport Protein (CERT) Function Alters Sphingomyelin Production following UVB Irradiation. *J Biol Chem* 2008; 283(24): 16682-92.
- [58] Ouasti S, Matarrese P, Paddon R, Khosravi-Far R, Sorice M, Tinari A, et al. Death receptor ligation triggers membrane scrambling between Golgi and mitochondria. *Cell Death Differ* 2007; 14(3): 453-61.
- [59] Lagace TA, Miller JR, Ridgway ND. Caspase processing and nuclear export of CTP: Phosphocholine cytidyltransferase alpha during farnesol-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002; 22(13): 4851-62.
- [60] Higa, T., Tanaka, J., Garcia-Gravalos, D. Oxy- and amino-substituted tetrahydrofuryl derivatives with antitumor activity. *US6864283* (2005).
- [61] Salma Y, Lafont E, Therville N, Carpentier S, Bonnafé MJ, Levade T, et al. The natural marine anhydrophytosphingosine, Jaspine B, induces apoptosis in melanoma cells by interfering with ceramide metabolism. *Biochem Pharmacol* 2009; 78(5): 477-85.
- [62] Kobayashi, S., Hanada, K. Sphingolipid synthesis inhibitor. *US6888015* (2005).
- [63] Hanada, K., Nishijima, M., Kumagai, K. Drug promoting ceramide transport, base sequence for producing the drug, method of measuring activity of promoting ceramide release and method of measuring activity of promoting intermembrane ceramide transfer. *US20080085859* (2008).
- [64] Schutze S, Potthoff K, Machleidt T, Berkovic D, Wiegmann K, Kronke M. TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 1992; 71(5): 765-76.
- [65] Wiegmann K, Schutze S, Machleidt T, Witte D, Kronke M. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 1994; 78(6): 1005-15.
- [66] Cifone MG, Roncaioli P, De Maria R, Camarda G, Santoni A, Ruberti G, et al. Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: Sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal. *Embo J* 1995; 14(23): 5859-68.
- [67] Machleidt T, Kramer B, Adam D, Neumann B, Schutze S, Wiegmann K, et al. Function of the p55 tumor necrosis factor receptor "death domain" mediated by phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *J Exp Med* 1996; 184(2): 725-33.
- [68] Meier, G.P., Bai, A., Zhou, D. Site and rate selective prodrug formulations of D609 with antioxidant and anticancer activity. *US20070244076* (2007).
- [69] Thon L, Mohlig H, Mathieu S, Lange A, Bulanova E, Winoto-Morbach S, et al. Ceramide mediates caspase-independent programmed cell death. *Faseb J* 2005; 19(14): 1945-56.
- [70] Porn-Ares MI, Chow SC, Slotte JP, Orrenius S. Induction of apoptosis and potentiation of TNF- and Fas-mediated apoptosis in U937 cells by the xanthogenate compound D609. *Exp Cell Res* 1997; 235(1): 48-54.
- [71] Zhang L, Shimizu S, Tsujimoto Y. Two distinct Fas-activated signaling pathways revealed by an antitumor drug D609. *Oncogene* 2005; 24(18): 2954-62.
- [72] Yang Z, Khoury C, Jean-Baptiste G, Greenwood MT. Identification of mouse sphingomyelin synthase 1 as a suppressor of Bax-mediated cell death in yeast. *FEMS Yeast Res* 2006; 6(5): 751-62.
- [73] Kilkus JP, Goswami R, Dawson SA, Testai FD, Berdyshev EV, Han X, et al. Differential regulation of sphingomyelin synthesis and catabolism in oligodendrocytes and neurons. *J Neurochem* 2008; 106(4): 1745-57.
- [74] Van der Luit AH, Budde M, Zerp S, Caan W, Klarenbeek JB, Verheij M, et al. Resistance to alkyl-lysophospholipid-induced apoptosis due to downregulated sphingomyelin synthase 1 expression with consequent sphingomyelin- and cholesterol-deficiency in lipid rafts. *Biochem J* 2007; 401(2): 541-9.
- [75] Veldman, R.J., Van Blitterswijk, W.J., Verheij, M., Koning, G.A. Pharmaceutical formulations employing short-chain sphingolipids and their use. *WO2005046637* (2005).
- [76] Modrak, D. Sphingomyelin enhancement of tumor therapy. *US6541462* (2003).
- [77] van Blitterswijk WJ, Klarenbeek JB, van der Luit AH, Alderliesten MC, van Lummel M, Verheij M. Fas/CD95 down-regulation in lymphoma cells through acquired alkyllysophospholipid resistance: Partial role of associated sphingomyelin deficiency. *Biochem J* 2010; 425(1): 225-34.
- [78] Miyaji M, Jin ZX, Yamaoka S, Amakawa R, Fukuhara S, Sato SB, et al. Role of membrane sphingomyelin and ceramide in platform formation for Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med* 2005; 202(2): 249-59.
- [79] Huang CR, Jin ZX, Dong L, Tong XP, Yue S, Kawanami T, et al. Cisplatin augments FAS-mediated apoptosis through lipid rafts. *Anticancer Res* 2010; 30(6): 2065-72.
- [80] Ding T, Li Z, Hailemariam T, Mukherjee S, Maxfield FR, Wu MP, et al. SMS overexpression and knockdown: Impact on cellular sphingomyelin and diacylglycerol metabolism, and cell apoptosis. *J Lipid Res* 2008; 49(2): 376-85.
- [81] Hailemariam TK, Huan C, Liu J, Li Z, Roman C, Kalbfleisch M, et al. Sphingomyelin synthase 2 deficiency attenuates NFkappaB activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(8): 1519-26.

REFERENCES

- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X & Akey CW (2002) Three-Dimensional Structure of the Apoptosome:: Implications for Assembly, Procaspase-9 Binding, and Activation. *Molecular cell* **9**: 423–432
- Adachi M, Suematsu S, Kondo T, Ogasawara J, Tanaka T, Yoshida N & Nagata S (1995) Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat. Genet* **11**: 294–300
- Adachi M, Suematsu S, Suda T, Watanabe D, Fukuyama H, Ogasawara J, Tanaka T, Yoshida N & Nagata S (1996) Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 2131
- Adam-Klages S, Adam D, Wiegmann K, Struve S, Kolanus W, Schneider-Mergener J & Kronke M (1996) FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* **86**: 937–947
- Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T & Alnemri ES (1997) CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer research* **57**: 615
- Ahn J-H (2001) Non-apoptotic Signaling Pathways Activated by Soluble Fas Ligand in Serum-starved Human Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 47100–47106
- Albi E & Magni MV (1999) Sphingomyelin synthase in rat liver nuclear membrane and chromatin. *FEBS letters* **460**: 369–372
- Albi E, Cataldi S, Rossi G, Viola Magni M, Toller M, Casani S & Perrella G (2008) The nuclear ceramide/diacylglycerol balance depends on the physiological state of thyroid cells and changes during UV-C radiation-induced apoptosis. *Archives of biochemistry and biophysics* **478**: 52–58
- Alcouffe J, Therville N, Ségui B, Nazzari D, Blaes N, Salvayre R, Thomsen M & Benoist H (2004) Expression of membrane-bound and soluble FasL in Fas- and FADD-dependent T lymphocyte apoptosis induced by mildly oxidized LDL. *FASEB J* **18**: 122–124
- Alderliesten M, Klarenbeek JB, van der Luit A, van Lummel M, Jones D, Zerp S, Divecha N, Verheij M & van Blitterswijk W (2011) Phosphoinositide phosphatase SHIP-1 regulates apoptosis induced by edelfosine, Fas ligation and DNA damage in mouse lymphoma cells. *Biochem. J.* Available at: <http://www.biochemj.org/bj/imps/refer.htm?msid=BJ20110125> [Consulté août 16, 2011]
- Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, Ramsdell F & Lynch DH (1993) Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* **178**: 2231
- Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, Goodwin RG, Smith CA, Ramsdell F & Lynch DH (1995) Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* **181**: 71
- Algeciras-Schimnich A & Peter ME (2002) Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* **22**: 207–220
- Algeciras-Schimnich A, Pietras EM, Barnhart BC, Legembre P, Vijayan S, Holbeck SL & Peter ME (2003) Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 11445
- Algeciras-Schimnich A & Peter ME (2003) Actin dependent CD95 internalization is specific for Type I cells. *FEBS Lett* **546**: 185–188
- Allouche M, Bettaieb A, Vindis C, Rousse A, Grignon C & Laurent G (1997) Influence of Bcl-2 overexpression on the ceramide pathway in daunorubicin-induced apoptosis of leukemic cells. *Oncogene* **14**: 1837–1845
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen GS, Thornberry NA, Wong W & Yuan J (1996) Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell* **87**:
- Ambrosini G, Adida C & Altieri DC (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med* **3**: 917–921
- Arai H, Gordon D, Nabel EG & Nabel GJ (1997) Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 13862
- Arase H, Arase N & Saito T (1995) Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* **181**: 1235

- Arora AS, Jones BJ, Patel TC, Bronk SF & Gores GJ (1997) Ceramide induces hepatocyte cell death through disruption of mitochondrial function in the rat. *Hepatology* **25**: 958-963
- Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A & others (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *Journal of Clinical Investigation* **104**: 155-162
- Baader E, Toloczko A, Fuchs U, Schmid I, Beltinger C, Ehrhardt H, Debatin KM & Jeremias I (2005) Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Mediated Proliferation of Tumor Cells with Receptor-Proximal Apoptosis Defects. *Cancer research* **65**: 7888
- Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL & Korsmeyer SJ (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
- Barnhart BC, Alappat EC & Peter ME (2003) The CD95 type I/type II model. Dans *Seminars in immunology* p 185-193.
- Barnhart BC, Legembre P, Pietras E, Bubici C, Franzoso G & Peter ME (2004) CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *The EMBO Journal* **23**: 3175-3185
- Barry M, Heibin JA, Pinkoski MJ, Lee SF, Moyer RW, Green DR & Bleackley RC (2000) Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Molecular and cellular biology* **20**: 3781
- Baumler CB, Bohler T, Herr I, Benner A, Krammer PH & Debatin KM (1996) Activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in T cells from human immunodeficiency virus type-1-infected children. *Blood* **88**: 1741
- Bejaoui K, Wu C, Scheffler MD, Haan G, Ashby P, Wu L, de Jong P & Brown RH Jr (2001) SPTLC1 is mutated in hereditary sensory neuropathy, type I. *Nat. Genet* **27**: 261-262
- Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, Brady C, Roche D, Collins JK & Shanahan F (1998) The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *The Journal of Immunology* **160**: 5669
- Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter J & others (1998) Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes & development* **12**: 1304
- Berube C, Boucher LM, Ma W, Wakeham A, Salmena L, Hakem R, Yeh WC, Mak TW & Benchimol S (2005) Apoptosis caused by p53-induced protein with death domain (PIDD) depends on the death adapter protein RAIDD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 14314
- Bezombes C, Ségui B, Cuvillier O, Bruno AP, Uro-Coste E, Gouazé V, Andrieu-Abadie N, Carpentier S, Laurent G, Salvayre R, Jaffrézou JP & Levade T (2001) Lysosomal sphingomyelinase is not solicited for apoptosis signaling. *FASEB J* **15**: 297-9
- Bielawska A, Crane HM, Liotta D, Obeid LM & Hannun YA (1993) Selectivity of ceramide-mediated biology. Lack of activity of erythrodiacylceramide. *J. Biol. Chem* **268**: 26226-26232
- Birbes H, El Bawab S, Hannun YA & Obeid LM (2001) Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. *The FASEB Journal* **15**: 2669
- Birbes H, Luberto C, Yi-Te Hsu SEB, Hannun YA & Obeid LM (2005) A mitochondrial pool of sphingomyelin is involved in TNF α -induced Bax translocation to mitochondria. *Biochemical Journal* **386**: 445
- van Blitterswijk WJ, Klarenbeek JB, van der Luit AH, Alderliesten MC, van Lummel M & Verheij M (2010) Fas/CD95 down-regulation in lymphoma cells through acquired alkyllysophospholipid resistance: partial role of associated sphingomyelin deficiency. *Biochem. J* **425**: 225-234
- Blott EJ, Bossi G, Clark R, Zvelebil M & Griffiths GM (2001) Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *Journal of Cell Science* **114**: 2405
- Boatright KM, Deis C, Denault JB, Sutherlin DP & Salvesen GS (2004) Activation of caspases-8 and-10 by FLIPL. *Biochemical journal* **382**: 651
- Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR & others (2003) A unified model for apical caspase activation. *Molecular cell* **11**: 529-541
- Bodmer J-L (2000) Cysteine 230 Is Essential for the Structure and Activity of the Cytotoxic Ligand TRAIL. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 20632-20637
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV & Wallach D (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**: 803-815

- Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH & Wallach D (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
- Bonhoure E, Lauret A, Barnes DJ, Martin C, Malavaud B, Kohama T, Melo JV & Cu villier O (2008) Sphingosine kinase-1 is a downstream regulator of imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* **22**: 971-979
- Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto K, Fuks Z & Kolesnick R (1995) Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell* **82**: 405-414
- Bossi G & Griffiths GM (1999) Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nature medicine* **5**: 90-96
- Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD & Green DR (1998) Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *The EMBO journal* **17**: 37-49
- Boudker O & Futerman AH (1993) Detection and characterization of ceramide-1-phosphate phosphatase activity in rat liver plasma membrane. *J. Biol. Chem* **268**: 22150-22155
- Bourteele S, Haußer A, Döppler H, Horn-Müller J, Röpke C, Schwarzmann G, Pfizenmaier K & Müller G (1998) Tumor necrosis factor induces ceramide oscillations and negatively controls sphingolipid synthases by caspases in apoptotic Kym-1 cells. *Journal of biological chemistry* **273**: 31245
- Bradley M, Zeytun A, Rafi-Janajreh A, Nagarkatti PS & Nagarkatti M (1998) Role of Spontaneous and Interleukin-2-Induced Natural Killer Cell Activity in the Cytotoxicity and Rejection of Fas+ and Fas- Tumor Cells. *Blood* **92**: 4248
- Brady RO, Kanfer JN, Mock MB & Fredrickson DS (1966) The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **55**: 366-369
- Bruno AP, Laurent G, Averbek D, Demur C, Bonnet J, Bettaieb A, Levade T & Jaffrézou JP (1998) Lack of ceramide generation in TF-1 human myeloid leukemic cells resistant to ionizing radiation. *Cell Death Differ* **5**: 172-182
- Cardone MH (1998) Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 by Phosphorylation. *Science* **282**: 1318-1321
- Cauwels A, Janssen B, Waeytens A, Cuvelier C & Brouckaert P (2003) Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2. *Nat Immunol* **4**: 387-393
- Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ & others (1992) Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **256**: 97
- Chai J, Wu Q, Shiozaki E, Srinivasula SM, Alnemri ES & Shi Y (2001) Crystal Structure of a Procaspase-7 Zymogen: Mechanisms of Activation and Substrate Binding. *Cell* **107**: 399-407
- Chaigne-Delalande B, Mahfouf W, Daburon S, Moreau J-F & Legembre P (2009) CD95 engagement mediates actin-independent and -dependent apoptotic signals. *Cell Death Differ* **16**: 1654-1664
- Chakrabandhu K, Hérincs Z, Huault S, Dost B, Peng L, Conchonaud F, Marguet D, He HT & Hueber AO (2006) Palmitoylation is required for efficient Fas cell death signaling. *The EMBO journal* **26**: 209-220
- Chalfant CE (2002) De Novo Ceramide Regulates the Alternative Splicing of Caspase 9 and Bcl-x in A549 Lung Adenocarcinoma Cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 12587-12595
- Chalfant CE (2003) The structural requirements for ceramide activation of serine-threonine protein phosphatases. *The Journal of Lipid Research* **45**: 496-506
- Chan FK-M, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL & Lenardo MJ (2000) A Domain in TNF Receptors That Mediates Ligand-Independent Receptor Assembly and Signaling. *Science* **288**: 2351-2354
- Chandran S & Machamer CE (2008) Acute perturbations in Golgi organization impact de novo sphingomyelin synthesis. *Traffic* **9**: 1894-1904
- Chang DW, Xing Z, Capacio VL, Peter ME & Yang X (2003) Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *The EMBO journal* **22**: 4132-4142
- Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME & Yang X (2002) c-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *The EMBO Journal* **21**: 3704-3714
- Charruyer A, Bell SM, Kawano M, Douangpanya S, Yen T-Y, Macher BA, Kumagai K, Hanada K, Holleran WM & Uchida Y (2008) Decreased Ceramide Transport Protein (CERT) Function Alters Sphingomyelin Production following UVB Irradiation. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 16682-16692

- Chen L, Park S-M, Tumanov AV, Hau A, Sawada K, Feig C, Turner JR, Fu Y-X, Romero IL, Lengyel E & Peter ME (2010) CD95 promotes tumour growth. *Nature* **465**: 492-496
- Cheng EHYA, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T & Korsmeyer SJ (2001) BCL-2, BCL-XL sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX-and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular cell* **8**: 705-711
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M & Dixit VM (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**: 505-512
- Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, Dale JK, Puck J, Davis J, Hall CG & others (2002) Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* **419**: 395-399
- Cifone MG, De Maria R, Roncaioli P, Rippon MR, Azuma M, Lanier LL, Santoni A & Testi R (1994) Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *Journal of Experimental Medicine* **180**: 1547
- Cifone MG, Roncaioli P, De Maria R, Camarda G, Santoni A, Ruberti G & Testi R (1995) Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal. *The EMBO journal* **14**: 5859
- Clancy L, Mruk K, Archer K, Woelfel M, Mongkolsapaya J, Screaton G, Lenardo MJ & Chan FKM (2005) Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 18099
- Clem RJ, Fechheimer M & Miller LK (1991) Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* **254**: 1388
- Cock JGR, Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ & Borst J (1998) CD95 (Fas/APO-1) induces ceramide formation and apoptosis in the absence of a functional acid sphingomyelinase. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 7560
- Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A & Olson MF (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature cell biology* **3**: 339-345
- Colie S, Van Veldhoven PP, Kedjouar B, Bedia C, Albinet V, Sorli S-C, Garcia V, Djavaheri-Mergny M, Bauvy C, Codogno P, Levade T & Andrieu-Abadie N (2009) Disruption of Sphingosine 1-Phosphate Lyase Confers Resistance to Chemotherapy and Promotes Oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL Upregulation. *Cancer Research* **69**: 9346-9353
- Colombini M (2010) Ceramide channels and their role in mitochondria-mediated apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*
- Crawford ED & Wells JA (2010) Caspase Substrates and Cellular Remodeling. *Annu Rev Biochem* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21456965> [Consulté mai 18, 2011]
- Crawford ED & Wells JA (2011) Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu. Rev. Biochem* **80**: 1055-1087
- Cremer A (2001) Ceramide Enables Fas to Cap and Kill. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 23954-23961
- Cretny E, Uldrich AP, Berzins SP, Strasser A, Godfrey DI & Smyth MJ (2003) Normal thymocyte negative selection in TRAIL-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* **198**: 491
- Cretny E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ & Smyth MJ (2002) Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J. Immunol* **168**: 1356-1361
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S & Spiegel S (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* **381**: 800-803
- Cuvillier O (2000) Involvement of Sphingosine in Mitochondria-dependent Fas-induced Apoptosis of Type II Jurkat T Cells. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 15691-15700
- Dawkins JL, Hulme DJ, Brahmabhatt SB, Auer-Grumbach M & Nicholson GA (2001) Mutations in SPTLC1, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit-1, cause hereditary sensory neuropathy type I. *Nature genetics* **27**: 309-312
- Dbaiibo GS, Pushkareva MY, Jayadev S, Schwarz JK, Horowitz JM, Obeid LM & Hannun YA (1995) Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependent pathway of growth arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 1347
- Debatin KM, Krammer PH, Goldman CK, Bamford R & Waldmann TA (1990) Monoclonal-antibody-mediated apoptosis in adult T-cell leukaemia. *The Lancet* **335**: 497-500

- Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA & Goodwin RG (1997a) The novel receptor TRAIL-R4 induces NF- κ B and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* **7**: 813–820
- Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, Goodwin RG & Smith CA (1997b) Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *The Journal of experimental medicine* **186**: 1165
- Dejean LM, Martinez-Caballero S, Guo L, Hughes C, Teijido O, Ducret T, Ichas F, Korsmeyer SJ, Antonsson B, Jonas EA & others (2005) Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Molecular biology of the cell* **16**: 2424
- Denault JB, Békés M, Scott FL, Sexton K, Bogyo M & Salvesen GS (2006) Engineered hybrid dimers: tracking the activation pathway of caspase-7. *Molecular cell* **23**: 523–533
- Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B & Martinou JC (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *The Journal of cell biology* **144**: 891
- Desbarats J & Newell MK (2000) Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nat. Med* **6**: 920-923
- Desbarats J, Birge RB, Mimouni-Rongy M, Weinstein DE, Palerme J-S & Newell MK (2003) Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol* **5**: 118-125
- Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS & Reed JC (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**: 300-304
- Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS & Reed JC (1999) Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *The EMBO Journal* **18**: 5242–5251
- Dhein J, Daniel PT, Trauth BC, Oehm A, Moller P & Krammer PH (1992) Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *The Journal of Immunology* **149**: 3166
- Ding T, Li Z, Hailemariam T, Mukherjee S, Maxfield FR, Wu M-P & Jiang X-C (2007) SMS overexpression and knockdown: impact on cellular sphingomyelin and diacylglycerol metabolism, and cell apoptosis. *The Journal of Lipid Research* **49**: 376-385
- Dobo J, Swanson R, Salvesen GS, Olson ST & Gettins PGW (2006) Cytokine Response Modifier A Inhibition of Initiator Caspases Results in Covalent Complex Formation and Dissociation of the Caspase Tetramer. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 38781-38790
- Dolgachev V (2004) De Novo Ceramide Accumulation Due to Inhibition of Its Conversion to Complex Sphingolipids in Apoptotic Photosensitized Cells. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 23238-23249
- Donepudi M, Sweeney AM, Briand C & Grutter MG (2003) Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Molecular cell* **11**: 543–549
- Droga-Mazovec G, Bojic L, Petelin A, Ivanova S, Romih R, Repnik U, Salvesen GS, Stoka V, Turk V & Turk B (2008) Cysteine Cathepsins Trigger Caspase-dependent Cell Death through Cleavage of Bid and Antiapoptotic Bcl-2 Homologues. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 19140-19150
- Droin N, Bichat F, Rébé C, Wotawa A, Sordet O, Hammann A, Bertrand R & Solary E (2001) Involvement of caspase-2 long isoform in Fas-mediated cell death of human leukemic cells. *Blood* **97**: 1835
- Du C, Fang M, Li Y, Li L & Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**: 33–42
- Duan H & Dixit VM (1997) RAIDD is a new « death » adaptor molecule. *Nature* **385**: 86-89
- Dumitru CA & Gulbins E (2006) TRAIL activates acid sphingomyelinase via a redox mechanism and releases ceramide to trigger apoptosis. *Oncogene* **25**: 5612–5625
- Dumitru CA, Carpinteiro A, Trarbach T, Hengge UR & Gulbins E (2007) Doxorubicin enhances TRAIL-induced cell death via ceramide-enriched membrane platforms. *Apoptosis* **12**: 1533-1541
- D'Angelo G, Polishchuk E, Tullio GD, Santoro M, Campli AD, Godi A, West G, Bielawski J, Chuang C-C, van der Spoel AC, Platt FM, Hannun YA, Polishchuk R, Mattjus P & De Matteis MA (2007) Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. *Nature* **449**: 62-67
- Edelmann B, Bertsch U, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Perrotta C, Jakob M, Adam-Klages S, Kabelitz D & Schütze S (2010) Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1 receptosomes. *The EMBO Journal* **30**: 379–394

- Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, Cleland MM, Arnoult D, Wang C, Neutzner A, Tjandra N & Youle RJ (2011) Bcl-xL Retrotranslocates Bax from the Mitochondria into the Cytosol. *Cell* **145**: 104-116
- Ehrhardt H, Fulda S, Schmid I, Hiscott J, Debatin K-M & Jeremias I (2003) TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF- κ B. *Oncogene* **22**: 3842-3852
- Ekert PG, Silke J & Vaux DL (1999) Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* **6**: 1081-1086
- El Bawab S (2001) Biochemical Characterization of the Reverse Activity of Rat Brain Ceramidase. A CoA-INDEPENDENT AND FUMONISIN B1-INSENSITIVE CERAMIDE SYNTHASE. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 16758-16766
- Elsässer-Beile U, Gierschner D, Welchner T & Wetterauer U (2003) Different expression of Fas and Fas ligand in tumor infiltrating and peripheral lymphocytes of patients with renal cell carcinomas. *Anticancer Res* **23**: 433-437
- Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R & others (1998) Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 14363
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A & Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**: 43-50
- Engels IH, Totzke G, Fischer U, Schulze-Osthoff K & Janicke RU (2005) Caspase-10 sensitizes breast carcinoma cells to TRAIL-induced but not tumor necrosis factor-induced apoptosis in a caspase-3-dependent manner. *Molecular and cellular biology* **25**: 2808
- Enoksson M (2004) Caspase-2 Permeabilizes the Outer Mitochondrial Membrane and Disrupts the Binding of Cytochrome c to Anionic Phospholipids. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 49575-49578
- Eramo A, Sargiacomo M, Ricci-Vitiani L, Todaro M, Stassi G, Messina CGM, Parolini I, Lotti F, Sette G, Peschle C & De Maria R (2004) CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells. *Eur. J. Immunol* **34**: 1930-1940
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B & Martinou JC (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Molecular and cellular biology* **20**: 929
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY & Henson PM (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* **101**: 890-898
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL & Henson PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology* **148**: 2207
- Feig C, Tchikov V, Schütze S & Peter ME (2006) Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *The EMBO journal* **26**: 221-231
- Feoktistova M, Geserick P, Kellert B, Dimitrova DP, Langlais C, Hupe M, Cain K, MacFarlane M, Häcker G & Leverkus M (2011) cIAPs Block Ripoptosome Formation, a RIP1/Caspase-8 Containing Intracellular Cell Death Complex Differentially Regulated by cFLIP Isoforms. *Molecular Cell* **43**: 449-463
- Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G & Alnemri ES (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**: 7464-9
- Finnberg N, Klein-Szanto AJP & El-Deiry WS (2008) TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* **118**: 111-123
- Fischer U, Stroh C & Schulze-Osthoff K (2005) Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene* **25**: 152-159
- Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ & Puck JM (1995) Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**: 935-946
- Fisher JL, Thomas-Mudge RJ, Elliott J, Hards DK, Sims NA, Slavin J, Martin TJ & Gillespie MT (2006) Osteoprotegerin overexpression by breast cancer cells enhances orthotopic and osseous tumor growth and contrasts with that delivered therapeutically. *Cancer research* **66**: 3620
- De Fost M, Vom Dahl S, Weverling GJ, Brill N, Häussinger D & Hollak CEM (2006) Increased incidence of cancer in adult Gaucher disease in Western Europe. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **36**: 53-58
- Friesen C, Herr I, Krammer PH & Debatin KM (1996) Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat. Med* **2**: 574-577

- Fuentes-Prior P & Salvesen GS (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemical Journal* **384**: 201
- Fugmann T, Hausser A, Schöffler P, Schmid S, Pfizenmaier K & Olayioye MA (2007) Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. *The Journal of Cell Biology* **178**: 15
- Fukasawa M, Nishijima M & Hanada K (1999) Genetic evidence for ATP-dependent endoplasmic reticulum-to-Golgi apparatus trafficking of ceramide for sphingomyelin synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol* **144**: 673-85
- Fulda S (2004) Signaling through death receptors in cancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology* **4**: 327-332
- Gajate C & Mollinedo F (2007) Edelfosine and perfosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood* **109**: 711
- Gajate C, del Canto-Janez E, Acuna AU, Amat-Guerri F, Geijo E, Santos-Beneit AM, Veldman RJ & Mollinedo F (2004) Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* **200**: 353
- Ganten TM, Koschny R, Sykora J, Schulze-Bergkamen H, Büchler P, Haas TL, Schader MB, Untergasser A, Stremmel W & Walczak H (2006) Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. *Clinical cancer research* **12**: 2640
- Ganten TM, Haas TL, Sykora J, Stahl H, Sprick MR, Fas SC, Krueger A, Weigand MA, Grosse-Wilde A, Stremmel W & others (2004) Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death & Differentiation* **11**: S86-S96
- Gao G & Dou QP (2000) N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J. Cell. Biochem* **80**: 53-72
- Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW & Thornberry NA (1998) Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 32608
- García-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A & Fernández-Checa JC (1997) Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 11369
- García-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Calvo M, Enrich C & Fernández-Checa JC (2003) Defective TNF-alpha-mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J. Clin. Invest* **111**: 197-208
- Garofalo T (2002) Association of the Death-inducing Signaling Complex with Microdomains after Triggering through CD95/Fas. EVIDENCE FOR CASPASE-8-GANGLIOSIDE INTERACTION IN T CELLS. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 8309-8315
- Geeraert L, Mannaerts GP & van Veldhoven PP (1997) Conversion of dihydroceramide into ceramide: involvement of a desaturase. *Biochemical Journal* **327**: 125
- Geserick P, Drewniok C, Hupe M, Haas TL, Diessenbacher P, Sprick MR, Schön MP, Henkler F, Gollnick H, Walczak H & others (2007) Suppression of cFLIP is sufficient to sensitize human melanoma cells to TRAIL- and CD95L-mediated apoptosis. *Oncogene* **27**: 3211-3220
- Geserick P, Hupe M, Moulin M, Wong W, Feoktistova M, Kellert B, Gollnick H, Silke J & Leverkus M (2009) Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment. *The Journal of Cell Biology* **187**: 1037
- Golks A (2005) c-FLIPR, a New Regulator of Death Receptor-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 14507-14513
- Gowda S, Yeang C, Wadgaonkar S, Anjum F, Grinkina N, Cutaia M, Jiang XC & Wadgaonkar R (2011) Sphingomyelin synthase 2 (SMS2) deficiency attenuates LPS-induced lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **300**: L430
- Granot T, Milhas D, Carpentier S, Dagan A, Segui B, Gatt S & Levade T (2006) Caspase-dependent and-independent cell death of Jurkat human leukemia cells induced by novel synthetic ceramide analogs. *Leukemia* **20**: 392-399
- Grassme H (2001) CD95 Signaling via Ceramide-rich Membrane Rafts. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 20589-20596
- Grassmé H, Cremesti A, Kolesnick R & Gulbins E (2003) Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene* **22**: 5457-5470
- Grazide S, Maestre N, Veldman RJ, Bezombes C, Maddens S, Levade T, Laurent G & Jaffrézou J-P (2002) Ara-C- and daunorubicin-induced recruitment of Lyn in sphingomyelinase-enriched membrane rafts. *FASEB J* **16**: 1685-1687

- Green DR & Ferguson TA (2001) The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **2**: 917-924
- Green DR & Evan GI (2002) A matter of life and death. *Cancer cell* **1**: 19–30
- Green DR, Ferguson T, Zitvogel L & Kroemer G (2009) Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat. Rev. Immunol* **9**: 353-363
- Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, Lynch DH & Kubin MZ (1998) Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *The journal of immunology* **161**: 2833
- Guan F, Handa K & Hakomori S (2009) Specific glycosphingolipids mediate epithelial-to-mesenchymal transition of human and mouse epithelial cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 7461
- Gudz TI, Tserng KY & Hoppel CL (1997) Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 24154
- Guenther GG, Peralta ER, Rosales KR, Wong SY, Siskind LJ & Edinger AL (2008) Ceramide starves cells to death by downregulating nutrient transporter proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**: 17402-17407
- Guo F, Sigua C, Tao J, Bali P, George P, Li Y, Wittmann S, Moscinski L, Atadja P & Bhalla K (2004) Cotreatment with histone deacetylase inhibitor LAQ824 enhances Apo-2L/tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-induced death inducing signaling complex activity and apoptosis of human acute leukemia cells. *Cancer Res* **64**: 2580-2589
- von Haefen C, Wieder T, Gillissen B, Stärck L, Graupner V, Dörken B & Daniel PT (2002) Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene* **21**: 4009-4019
- Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J & Tschopp J (1996) Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* **274**: 1363-1366
- Hailemariam TK, Huan C, Liu J, Li Z, Roman C, Kalbfleisch M, Bui HH, Peake DA, Kuo MS, Cao G & others (2008) Sphingomyelin Synthase 2 Deficiency Attenuates NF κ B Activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**: 1519
- Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z & Kolesnick RN (1994) Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *The Journal of experimental medicine* **180**: 525
- Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W & others (1998) Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* **94**: 339–352
- Halter D, Neumann S, Van Dijk SM, Wolthoorn J, De Mazière AM, Vieira OV, Mattjus P, Klumperman J, Van Meer G & Sprong H (2007) Pre- and post-Golgi translocation of glucosylceramide in glycosphingolipid synthesis. *The Journal of Cell Biology* **179**: 101
- Hampton RY & Morand OH (1989) Sphingomyelin synthase and PKC activation. *Science* **246**: 1050
- Hanabuchi S, Koyanagi M, Kawasaki A, Shinohara N, Matsuzawa A, Nishimura Y, Kobayashi Y, Yonehara S, Yagita H & Okumura K (1994) Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 4930
- Hanada K, Nishijima M, Kiso M, Hasegawa A, Fujita S, Ogawa T & Akamatsu Y (1992) Sphingolipids are essential for the growth of Chinese hamster ovary cells. Restoration of the growth of a mutant defective in sphingoid base biosynthesis by exogenous sphingolipids. *J. Biol. Chem* **267**: 23527-23533
- Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M & Nishijima M (2003) Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **426**: 803–809
- Hanada K, Nishijima M, Fujita T & Kobayashi S (2000) Specificity of inhibitors of serine palmitoyltransferase (SPT), a key enzyme in sphingolipid biosynthesis, in intact cells: A novel evaluation system using an SPT-defective mammalian cell mutant. *Biochemical pharmacology* **59**: 1211–1216
- Hanahan D, Weinberg RA & Cambridge M (2000) The Hallmarks of Cancer Review. *Cell* **100**: 57–70
- He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L & Wang X (2009) Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- α . *Cell* **137**: 1100-1111
- Hengartner MO & Horvitz HR (1994) C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* **76**: 665-676
- Henkler F, Behrle E, Dennehy KM, Wicovsky A, Peters N, Warnke C, Pfizenmaier K & Wajant H (2005) The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability. *The Journal of cell biology* **168**: 1087

- Herbst RS, Eckhardt SG, Kurzrock R, Ebbinghaus S, O'Dwyer PJ, Gordon MS, Novotny W, Goldwasser MA, Tohnya TM, Lum BL, Ashkenazi A, Jubb AM & Mendelson DS (2010) Phase I Dose-Escalation Study of Recombinant Human Apo2L/TRAIL, a Dual Proapoptotic Receptor Agonist, in Patients With Advanced Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **28**: 2839-2846
- Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH & Ley TJ (1994) Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* **76**: 977-987
- Ho LH, Taylor R, Dorstyn L, Cakouros D, Bouillet P & Kumar S (2009) A tumor suppressor function for caspase-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 5336
- Hobson JP, Rosenfeldt HM, Barak LS, Olivera A, Poulton S, Caron MG, Milstien S & Spiegel S (2001) Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* **291**: 1800-1803
- Hohlbaum AM, Moe S & Marshak-Rothstein A (2000) Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. *The Journal of Experimental Medicine* **191**: 1209
- Hojjati MR, Li Z & Jiang X-C (2005) Serine palmitoyl-CoA transferase (SPT) deficiency and sphingolipid levels in mice. *Biochim. Biophys. Acta* **1737**: 44-51
- Holler N, Tardivel A, Kovacsics-Bankowski M, Hertig S, Gaide O, Martinon F, Tinel A, Deperthes D, Calderara S, Schulthess T & others (2003) Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Molecular and cellular biology* **23**: 1428
- Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B & Tschopp J (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature immunology* **1**: 489-495
- Horinouchi K, Erlich S, Perl DP, Ferlinz K, Bisgaier CL, Sandhoff K, Desnick RJ, Stewart CL & Schuchman EH (1995) Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nat. Genet* **10**: 288-293
- Horvitz HR (1999) Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer research* **59**: 1701s
- Hsu H, Xiong J & Goeddel DV (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**: 495-504
- Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V & Goeddel DV (1996a) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* **4**: 387-396
- Hsu H, Shu HB, Pan MG & Goeddel DV (1996b) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* **84**: 299-308
- Hsu YT, Wolter KG & Youle RJ (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 3668
- Hu W, Xu R, Zhang G, Jin J, Szulc ZM, Bielawski J, Hannun YA, Obeid LM & Mao C (2005) Golgi fragmentation is associated with ceramide-induced cellular effects. *Mol. Biol. Cell* **16**: 1555-1567
- Hu X, Yang D, Zimmerman M, Liu F, Yang J, Kannan S, Burchert A, Szulc Z, Bielawska A, Ozato K, Bhalla K & Liu K (2011) IRF8 Regulates Acid Ceramidase Expression to Mediate Apoptosis and Suppresses Myelogenous Leukemia. *Cancer Research* **71**: 2882-2891
- Huang DC & Strasser A (2000) BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* **103**: 839-842
- Huang D, Hahne M, Schroeter M, Frei K, Fontana A, Villunger A, Newton K, Tschopp J & Strasser A (1999) Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-xL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 14871
- Hueber A-O, Bernard A-M, Herincs Z, Couzinet A & He H-T (2002) An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep* **3**: 190-196
- Hughes MA, Harper N, Butterworth M, Cain K, Cohen GM & MacFarlane M (2009) Reconstitution of the Death-Inducing Signaling Complex Reveals a Substrate Switch that Determines CD95-Mediated Death or Survival. *Molecular Cell* **35**: 265-279
- Huitema K, Van Den Dikkenberg J, Brouwers JFHM & Holthuis JCM (2003) Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *The EMBO Journal* **23**: 33-44
- Huynh M-LN, Fadok VA & Henson PM (2002) Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* **109**: 41-50

- Hymowitz SG, Christinger HW, Fuh G, Ultsch M, O'Connell M, Kelley RF, Ashkenazi A & de Vos AM (1999) Triggering Cell Death: The Crystal Structure of Apo2L/TRAIL in a Complex with Death Receptor 5. *Molecular Cell* **4**: 563–571
- Ichikawa K, Liu W, Zhao L, Wang Z, Liu D, Ohtsuka T, Zhang H, Mountz JD, Koopman WJ, Kimberly RP & others (2001) Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nature medicine* **7**: 954–960
- Inohara N, Koseki T, Hu Y, Chen S & Núñez G (1997) CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 10717
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C & others (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**: 190–194
- Ishimura N, Isomoto H, Bronk SF & Gores GJ (2006) Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **290**: G129
- Itoh M, Kitano T, Watanabe M, Kondo T, Yabu T, Taguchi Y, Iwai K, Tashima M, Uchiyama T & Okazaki T (2003) Possible Role of Ceramide as an Indicator of Chemoresistance. *Clinical cancer research* **9**: 415
- Itoh N & Nagata S (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 10932
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S-I, Sameshima M, Hase A, Seto Y & Nagata S (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**: 233-243
- Jarvis WD, Fornari FA Jr, Browning JL, Gewirtz DA, Kolesnick RN & Grant S (1994) Attenuation of ceramide-induced apoptosis by diglyceride in human myeloid leukemia cells. *J. Biol. Chem* **269**: 31685-31692
- Jin Z & El-Deiry WS (2006) Distinct Signaling Pathways in TRAIL- versus Tumor Necrosis Factor-Induced Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* **26**: 8136-8148
- Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR & Ashkenazi A (2009) Cullin3-Based Polyubiquitination and p62-Dependent Aggregation of Caspase-8 Mediate Extrinsic Apoptosis Signaling. *Cell* **137**: 721-735
- Jin Z-X, Huang C-R, Dong L, Goda S, Kawanami T, Sawaki T, Sakai T, Tong X-P, Masaki Y, Fukushima T, Tanaka M, Mimori T, Tojo H, Bloom ET, Okazaki T & Umehara H (2008) Impaired TCR signaling through dysfunction of lipid rafts in sphingomyelin synthase 1 (SMS1)-knockdown T cells. *Int Immunol* **20**: 1427-37
- Jo M, Kim TH, Seol DW, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR & Strom SC (2000) Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat. Med* **6**: 564-567
- Jost PJ, Grabow S, Gray D, McKenzie MD, Nachbur U, Huang DCS, Bouillet P, Thomas HE, Borner C, Silke J, Strasser A & Kaufmann T (2009) XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* **460**: 1035-1039
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CYJ, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HYM, Ravagnan L & others (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**: 549–554
- Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ & Marshak-Rothstein A (1995) Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* **373**: 444-448
- Ju ST, Cui H, Panka DJ, Ettinger R & Marshak-Rothstein A (1994) Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4+ Th1 and CD8+ cytotoxic T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 4185
- Juo P, Kuo CJ, Yuan J & Blenis J (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Current Biology* **8**: 1001–1008
- Juo P, Sue-Ann Woo M, Kuo CJ, Signorelli P, Biemann HP, Hannun YA & Blenis J (1999) FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. *Cell Growth and Differentiation* **10**: 797
- Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H & Golstein P (1994) Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* **265**: 528
- Kaiser WJ, Upton JW, Long AB, Livingston-Rosanoff D, Daley-Bauer LP, Hakem R, Caspary T & Mocarski ES (2011) RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature* **471**: 368-372
- Kamitani T, Nguyen HP & Yeh ETH (1997) Activation-induced aggregation and processing of the human Fas antigen. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 22307

- Kang TB, Oh GS, Scandella E, Bolinger B, Ludewig B, Kovalenko A & Wallach D (2008) Mutation of a self-processing site in caspase-8 compromises its apoptotic but not its nonapoptotic functions in bacterial artificial chromosome-transgenic mice. *The Journal of Immunology* **181**: 2522
- Karbowski M, Norris KL, Cleland MM, Jeong S-Y & Youle RJ (2006) Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* **443**: 658-662
- Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A & Green DR (1998) DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- κ B and AP-1. *Molecular cell* **1**: 543-551
- Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K & Yagita H (1995) Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *The Journal of experimental medicine* **182**: 1777
- Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, Russell EK & Lipkowitz S (1999) Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer research* **59**: 734
- Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J & Budd RC (1999) Caspase activation is required for T cell proliferation. *The Journal of experimental medicine* **190**: 1891
- Keogh SA, Walczak H, Bouchier-Hayes L & Martin SJ (2000) Failure of Bcl-2 to block cytochrome c redistribution during TRAIL-induced apoptosis. *FEBS letters* **471**: 93-98
- Kerr JF, Wyllie AH & Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**: 239-257
- Kilkus JP, Goswami R, Dawson SA, Testai FD, Berdyshev EV, Han X & Dawson G (2008) Differential regulation of sphingomyelin synthesis and catabolism in oligodendrocytes and neurons. *J. Neurochem* **106**: 1745-1757
- Kim B-J (2006) JNK- and p38 Kinase-mediated Phosphorylation of Bax Leads to Its Activation and Mitochondrial Translocation and to Apoptosis of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 21256-21265
- Kim HE, Du F, Fang M & Wang X (2005) Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 17545
- Kim K, Fisher MJ, Xu SQ & El-Deiry WS (2000) Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clinical cancer research* **6**: 335
- Kim Y-S, Morgan MJ, Choksi S & Liu Z-gang (2007) TNF-Induced Activation of the Nox1 NADPH Oxidase and Its Role in the Induction of Necrotic Cell Death. *Molecular Cell* **26**: 675-687
- Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ & Ashkenazi A (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* **12**: 611-620
- Kischkel FC (2001) Death Receptor Recruitment of Endogenous Caspase-10 and Apoptosis Initiation in the Absence of Caspase-8. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 46639-46646
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Kramer PH & Peter ME (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal* **14**: 5579
- Klas C, Debatin KM, Jonker RR & Kramer PH (1993) Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int. Immunol* **5**: 625-630
- Kohlhaas SL, Craxton A, Sun X-M, Pinkoski MJ & Cohen GM (2007) Receptor-mediated Endocytosis Is Not Required for Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 12831-12841
- Kojima H, Shinohara N, Hanaoka S, Someya-Shirota Y, Takagaki Y, Ohno H, Saito T, Katayama T, Yagita H, Okumura K, Shinkai Y, Alt FW, Matsuzawa A, Yonehara S & Takayama H (1994) Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* **1**: 357-364
- Kollmann K, Pohl S, Marschner K, Encarnação M, Sakwa I, Tiede S, Poorthuis BJ, Lübke T, Müller-Loennies S, Storch S & others (2010) Mannose phosphorylation in health and disease. *European journal of cell biology* **89**: 117-123
- Kondo K, Yamasaki S, Sugie T, Teratani N, Kan T, Imamura M & Shimada Y (2006) Cisplatin-dependent upregulation of death receptors 4 and 5 augments induction of apoptosis by TNF-related apoptosis-inducing ligand against esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer* **118**: 230-242
- Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M & Nagata S (1997) Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat. Med* **3**: 409-413

- Kono M (2006) Neutral Ceramidase Encoded by the Asah2 Gene Is Essential for the Intestinal Degradation of Sphingolipids. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 7324-7331
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH & others (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell death and differentiation* **7**: 1166-1173
- Koschny R, Ganten TM, Sykora J, Haas TL, Sprick MR, Kolb A, Stremmel W & Walczak H (2007) TRAIL/bortezomib cotreatment is potentially hepatotoxic but induces cancer-specific apoptosis within a therapeutic window. *Hepatology* **45**: 649-658
- Kothakota S (1997) Caspase-3-Generated Fragment of Gelsolin: Effector of Morphological Change in Apoptosis. *Science* **278**: 294-298
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR & others (2008) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation* **16**: 3-11
- Kroesen BJ, Pettus B, Luberto C, Busman M, Sietsma H, de Leij L & Hannun YA (2001) Induction of apoptosis through B-cell receptor cross-linking occurs via de novo generated C16-ceramide and involves mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 13606
- Krueger A (2001) Cellular FLICE-inhibitory Protein Splice Variants Inhibit Different Steps of Caspase-8 Activation at the CD95 Death-inducing Signaling Complex. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 20633-20640
- Ku NO, Liao J & Omary MB (1997) Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 33197
- Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MSS, Rakic P & Flavell RA (1998) Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* **94**: 325-337
- Kumagai K, Kawano M, Shinkai-Ouchi F, Nishijima M & Hanada K (2007) Interorganellar Trafficking of Ceramide Is Regulated by Phosphorylation-dependent Cooperativity between the PH and START Domains of CERT. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 17758-17766
- Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR & Newmeyer DD (2002) Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**: 331-342
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S & others (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**: 165-176
- Lacour S, Hammann A, Grazide S, Lagadic-Gossman D, Athias A, Sergent O, Laurent G, Gambert P, Solary E & Dimanche-Boitrel MT (2004) Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer research* **64**: 3593
- Lacour S, Hammann A, Wotawa A, Corcos L, Solary E & Dimanche-Boitrel MT (2001) Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *Cancer research* **61**: 1645
- Lacour S, Micheau O, Hammann A, Drouineaud V, Tschopp J, Solary E & Dimanche-Boitrel M-T (2003) Chemotherapy enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand DISC assembly in HT29 human colon cancer cells. *Oncogene* **22**: 1807-1816
- Lagace TA, Miller JR & Ridgway ND (2002) Caspase Processing and Nuclear Export of CTP: Phosphocholine Cytidylyltransferase α during Farnesol-Induced Apoptosis. *Molecular and cellular biology* **22**: 4851
- Lalaoui N, Morlé A, Mérino D, Jacquemin G, Iessi E, Morizot A, Shirley S, Robert B, Solary E, Garrido C & Micheau O (2011) TRAIL-R4 Promotes Tumor Growth and Resistance to Apoptosis in Cervical Carcinoma HeLa Cells through AKT. *PLoS ONE* **6**: e19679
- Lamhamedi-Cherradi S-E, Zheng S-J, Maguschak KA, Peschon J & Chen YH (2003) Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL $^{-/-}$ mice. *Nat Immunol* **4**: 255-260
- Lane JD, Vergnolle MAS, Woodman PG & Allan VJ (2001) Apoptotic cleavage of cytoplasmic dynein intermediate chain and p150GluedStops dynein-dependent membrane motility. *The Journal of Cell Biology* **153**: 1415
- Lassus P (2002) Requirement for Caspase-2 in Stress-Induced Apoptosis Before Mitochondrial Permeabilization. *Science* **297**: 1352-1354
- Laster SM, Wood JG & Gooding LR (1988) Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *The Journal of Immunology* **141**: 2629
- Laviad EL, Albee L, Pankova-Kholmyansky I, Epstein S, Park H, Merrill AH & Futerman AH (2007) Characterization of Ceramide Synthase 2: TISSUE DISTRIBUTION, SUBSTRATE SPECIFICITY, AND INHIBITION BY SPHINGOSINE 1-PHOSPHATE. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 5677-5684

- Lavrik I, Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Weyd H, Krammer PH & Kirchhoff S (2003) The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death Differ* **10**: 144-145
- Lavrik IN, Golks A, Riess D, Bentele M, Eils R & Krammer PH (2007) Analysis of CD95 Threshold Signaling: TRIGGERING OF CD95 (FAS/APO-1) AT LOW CONCENTRATIONS PRIMARILY RESULTS IN SURVIVAL SIGNALING. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 13664-13671
- Lavrik IN, Mock T, Golks A, Hoffmann JC, Baumann S & Krammer PH (2008) CD95 Stimulation Results in the Formation of a Novel Death Effector Domain Protein-containing Complex. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 26401-26408
- Lavrik IN, Golks A, Baumann S & Krammer PH (2006) Caspase-2 is activated at the CD95 death-inducing signaling complex in the course of CD95-induced apoptosis. *Blood* **108**: 559-65
- Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, *et al.* (2001) Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat. Med* **7**: 383-385
- LeBlanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, Totpal K, Morlan J, Schow P, Fong S, Schwall R, Sinicropi D & Ashkenazi A (2002) Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat. Med* **8**: 274-281
- Lee JY, Hannun YA & Obeid LM (1996) Ceramide inactivates cellular protein kinase Calpha. *J. Biol. Chem* **271**: 13169-13174
- Lee KH, Feig C, Tchikov V, Schickel R, Hallas C, Schütze S, Peter ME & Chan AC (2006) The role of receptor internalization in CD95 signaling. *The EMBO journal* **25**: 1009-1023
- Lee Y & Shacter E (2001) Fas aggregation does not correlate with Fas-mediated apoptosis. *The Journal of Immunology* **167**: 82
- Legembre P, Beneteau M, Daburon S, Moreau JF & Taupin JL (2003) Cutting edge: SDS-stable Fas microaggregates: an early event of Fas activation occurring with agonistic anti-Fas antibody but not with Fas ligand. *The Journal of Immunology* **171**: 5659
- Legembre P, Daburon S, Moreau P, Moreau JF & Taupin JL (2006) Cutting edge: modulation of Fas-mediated apoptosis by lipid rafts in T lymphocytes. *The Journal of Immunology* **176**: 716
- Legembre P, Barnhart BC, Zheng L, Vijayan S, Straus SE, Puck J, Dale JK, Lenardo M & Peter ME (2004) Induction of apoptosis and activation of NF- κ B by CD95 require different signalling thresholds. *EMBO Rep* **5**: 1084-1089
- Leong S, Cohen RB, Gustafson DL, Langer CJ, Camidge DR, Padavic K, Gore L, Smith M, Chow LQ, von Mehren M, O'Bryant C, Hariharan S, Diab S, Fox NL, Miceli R & Eckhardt SG (2009) Mapatumumab, an Antibody Targeting TRAIL-R1, in Combination With Paclitaxel and Carboplatin in Patients With Advanced Solid Malignancies: Results of a Phase I and Pharmacokinetic Study. *Journal of Clinical Oncology* **27**: 4413-4421
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S & Korsmeyer SJ (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer cell* **2**: 183-192
- Lette G & Hengartner MO (2006) Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **7**: 97-108
- Li C-M, Park J-H, Simonaro CM, He X, Gordon RE, Friedman A-H, Ehleiter D, Paris F, Manova K, Hepbilkler S, Fuks Z, Sandhoff K, Kolesnick R, Schuchman EH & Hepbiloikler S (2002) Insertional mutagenesis of the mouse acid ceramidase gene leads to early embryonic lethality in homozygotes and progressive lipid storage disease in heterozygotes. *Genomics* **79**: 218-224
- Li H, Zhu H, Xu CJ & Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**: 491-501
- Li K, Li Y, Shelton JM, Richardson JA, Spencer E, Chen ZJ, Wang X & Williams RS (2000) Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* **101**: 389-399
- Li LY, Luo X & Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**: 95-99
- Li L (2004) A Small Molecule Smac Mimic Potentiates TRAIL- and TNF -Mediated Cell Death. *Science* **305**: 1471-1474
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES & Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-489
- Lin T, Brunner T, Tietz B, Madsen J, Bonfoco E, Reaves M, Huflejt M & Green DR (1998) Fas ligand- mediated killing by intestinal intraepithelial lymphocytes. Participation in intestinal graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* **101**: 570-577
- Lin T, Genestier L, Pinkoski MJ, Castro A, Nicholas S, Mogil R, Paris F, Fuks Z, Schuchman EH, Kolesnick RN & others (2000) Role of acidic sphingomyelinase in Fas/CD95-mediated cell death. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 8657

- Lin Y (2003) Tumor Necrosis Factor-induced Nonapoptotic Cell Death Requires Receptor-interacting Protein-mediated Cellular Reactive Oxygen Species Accumulation. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 10822-10828
- Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K & others (2000) The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Molecular cell* **6**: 1389-1399
- Liu B, Andrieu-Abadie N, Levade T, Zhang P, Obeid LM & Hannun YA (1998) Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *J. Biol. Chem* **273**: 11313-11320
- Liu P & Anderson RGW (1995) Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 27179
- Liu X, Zou H, Slaughter C & Wang X (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**: 175-184
- Liu YY, Han TY, Giuliano AE, Ichikawa S, Hirabayashi Y & Cabot MC (1999) Glycosylation of ceramide potentiates cellular resistance to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Exp. Cell Res* **252**: 464-470
- Liu YY, Yu JY, Yin D, Patwardhan GA, Gupta V, Hirabayashi Y, Holleran WM, Giuliano AE, Jazwinski SM, Gouaze-Andersson V & others (2008) A role for ceramide in driving cancer cell resistance to doxorubicin. *The FASEB Journal* **22**: 2541
- Lowin B, Hahne M, Mattmann C & Tschopp J (1994) Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* **370**: 650-652
- Luberto C & Hannun YA (1998) Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation. Does sphingomyelin synthase account for the putative phosphatidylcholine-specific phospholipase C? *J. Biol. Chem* **273**: 14550-14559
- van der Luit AH, Vink SR, Klarenbeek JB, Perrissoud D, Solary E, Verheij M & van Blitterswijk WJ (2007) A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics* **6**: 2337
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C & Wang X (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**: 481-490
- MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM & Alnemri ES (1997) Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 25417
- Magerus-Chatinet A, Neven B, Stolzenberg MC, Daussy C, Arkwright PD, Lanzarotti N, Schaffner C, Cluet-Dennetiere S, Haerynck F, Michel G & others (2011) Onset of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in humans as a consequence of genetic defect accumulation. *The Journal of Clinical Investigation* **121**: 106
- Mancini M, Machamer CE, Roy S, Nicholson DW, Thornberry NA, Casciola-Rosen LA & Rosen A (2000) Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *Science's STKE* **149**: 603
- Manzl C, Krumschnabel G, Bock F, Sohm B, Labi V, Baumgartner F, Logette E, Tschopp J & Villunger A (2009) Caspase-2 activation in the absence of PIDDosome formation. *The Journal of Cell Biology* **185**: 291
- Mao C & Obeid LM (2008) Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1781**: 424-434
- Mao C, Xu R, Bielawska A & Obeid LM (2000) Cloning of an Alkaline Ceramidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 6876
- De Maria R (1997) Requirement for GD3 Ganglioside in CD95- and Ceramide-Induced Apoptosis. *Science* **277**: 1652-1655
- De Maria R, Rippo MR, Schuchman EH & Testi R (1998) Acidic sphingomyelinase (ASM) is necessary for fas-induced GD3 ganglioside accumulation and efficient apoptosis of lymphoid cells. *The Journal of experimental medicine* **187**: 897
- Marsh BJ, Mastronarde DN, Buttle KF, Howell KE & McIntosh JR (2001) Organellar relationships in the Golgi region of the pancreatic beta cell line, HIT-T15, visualized by high resolution electron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 2399
- Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P & Ashkenazi A (1997) A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr. Biol* **7**: 1003-1006
- Martin SJ, Amarante-Mendes GP, Shi L, Chuang TH, Casiano CA, O'Brien GA, Fitzgerald P, Tan EM, Bokoch GM, Greenberg AH & others (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. *The EMBO journal* **15**: 2407

- Martínez-Lorenzo MJ, Alava MA, Gamen S, Kim KJ, Chuntharapai A, Piñeiro A, Naval J & Anel A (1998) Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. *Eur. J. Immunol* **28**: 2714-2725
- Matsumura H, Shimizu Y, Ohsawa Y, Kawahara A, Uchiyama Y & Nagata S (2000) Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *The Journal of cell biology* **151**: 1247
- Matsuno H, Yudoh K, Watanabe Y, Nakazawa F, Aono H & Kimura T (2001) Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand. *The Journal of rheumatology* **28**: 22
- McStay GP, Salvesen GS & Green DR (2008) Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death Differ* **15**: 322-331
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH & Peter ME (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *The EMBO journal* **16**: 2794-2804
- van Meer G & Lisman, Q. (2002) Sphingolipid Transport: Rafts and Translocators. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 25855-25858
- Melino G (2001) The sirens' song. *Nature* **412**: 23
- Memon RA, Holleran WM, Moser AH, Seki T, Uchida Y, Fuller J, Shigenaga JK, Grunfeld C & Feingold KR (1998) Endotoxin and cytokines increase hepatic sphingolipid biosynthesis and produce lipoproteins enriched in ceramides and sphingomyelin. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **18**: 1257
- Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Schneider P, Solary E & Micheau O (2006) Differential Inhibition of TRAIL-Mediated DR5-DISC Formation by Decoy Receptors 1 and 2. *Molecular and Cellular Biology* **26**: 7046-7055
- Merrill AH (2002) De Novo Sphingolipid Biosynthesis: A Necessary, but Dangerous, Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 25843-25846
- Micheau O (2002) The Long Form of FLIP Is an Activator of Caspase-8 at the Fas Death-inducing Signaling Complex. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 45162-45171
- Micheau O & Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**: 181-190
- Micheau O, Solary E, Hammann A, Martin F & Dimanche-Boitrel MT (1997) Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **89**: 783
- Migone TS, Zhang J, Luo X, Zhuang L, Chen C, Hu B, Hong JS, Perry JW, Chen SF, Zhou JXH & others (2002) TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immunity* **16**: 479-492
- Milhas D, Clarke CJ & Hannun YA (2009) Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: Implications for bioactive sphingolipids. *FEBS letters*
- Milhas D, Cuvillier O, Therville N, Clavé P, Thomsen M, Levade T, Benoist H & Ségui B (2005) Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J Biol Chem* **280**: 19836-42
- Mitchell KO, Ricci MS, Miyashita T, Dicker DT, Jin Z, Reed JC & El-Deiry WS (2000) Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer research* **60**: 6318
- Mitsiades N, Yu W, Poulaki V, Tsokos M & Stamenkovic I (2001) Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer research* **61**: 577
- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA & Yuan J (1993) Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the C. elegans cell death gene ced-3. *Cell* **75**: 653-660
- Miyaji M, Jin Z-X, Yamaoka S, Amakawa R, Fukuhara S, Sato SB, Kobayashi T, Domae N, Mimori T, Bloom ET, Okazaki T & Umehara H (2005) Role of membrane sphingomyelin and ceramide in platform formation for Fas-mediated apoptosis. *J. Exp. Med* **202**: 249-259
- Miyashita T & Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**: 293-299
- Monleón I, Martínez-Lorenzo MJ, Monteagudo L, Laserra P, Taulés M, Iturralde M, Piñeiro A, Larrad L, Alava MA, Naval J & others (2001) Differential secretion of Fas ligand-or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *The Journal of Immunology* **167**: 6736
- Morishima N (1999) Changes in nuclear morphology during apoptosis correlate with vimentin cleavage by different caspases located either upstream or downstream of Bcl-2 action - Morishima - 2001 - Genes to Cells - Wiley Online Library. *Genes to Cells* **4**: 401-414

- Morizot A, Mérino D, Lalaoui N, Jacquemin G, Granci V, Iessi E, Lanneau D, Bouyer F, Solary E, Chauffert B & others (2010) Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level. *Cell Death & Differentiation*
- Movsesyan VA, Yakovlev AG, Dabaghyan EA, Stoica BA & Faden AI (2002) Ceramide induces neuronal apoptosis through the caspase-9/caspase-3 pathway. *Biochemical and biophysical research communications* **299**: 201–207
- Mukherjee S, Chiu R, Leung S-M & Shields D (2007) Fragmentation of the Golgi Apparatus: An Early Apoptotic Event Independent of the Cytoskeleton - Mukherjee - 2007 - Traffic - Wiley Online Library. *Traffic* **8**: 369-378
- Muppidi JR & Siegel RM (2004) Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. *Nat Immunol* **5**: 182-189
- Murphy BM (2004) Interchain Proteolysis, in the Absence of a Dimerization Stimulus, Can Initiate Apoptosis-associated Caspase-8 Activation. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 36916-36922
- Muzio M, Salvesen GS & Dixit VM (1997) FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J. Biol. Chem* **272**: 2952-2956
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R & others (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **85**: 817–827
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS & Dixit VM (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 2926
- Nagane M, Pan G, Weddle JJ, Dixit VM, Cavenee WK & Huang HJS (2000) Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo. *Cancer research* **60**: 847
- Nagiec MM, Baltisberger JA, Wells GB, Lester RL & Dickson RC (1994) The LCB2 gene of *Saccharomyces* and the related LCB1 gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 7899
- Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T & Tsujimoto Y (2005) Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **434**: 652-658
- Nehme R & Conradt B (2008) egl-1: a key activator of apoptotic cell death in *C. elegans*. *Oncogene* **27**: S30-S40
- Neumeier J, Hallas C, Merkel O, Winoto-Morbach S, Jakob M, Thon L, Adam D, Schneider-Brachert W & Schütze S (2006) TNF-receptor I defective in internalization allows for cell death through activation of neutral sphingomyelinase. *Experimental cell research* **312**: 2142–2153
- Nicholson KM, Quinn DM, Kellett GL & Warr JR (1999) Preferential killing of multidrug-resistant KB cells by inhibitors of glucosylceramide synthase. *British journal of cancer* **81**: 423
- Noguchi M, Kabayama K, Uemura S, Kang B, Saito M, Igarashi Y & Inokuchi J (2006) Endogenously produced ganglioside GM3 endows etoposide and doxorubicin resistance by up-regulating Bcl-2 expression in 3LL Lewis lung carcinoma cells. *Glycobiology* **16**: 641
- Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA & Hannun YA (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**: 1769-1771
- Oberst A, Pop C, Tremblay AG, Blais V, Denault JB, Salvesen GS & Green DR (2010) Inducible Dimerization and Inducible Cleavage Reveal a Requirement for Both Processes in Caspase-8 Activation. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 16632-16642
- Oberst A, Dillon CP, Weinlich R, McCormick LL, Fitzgerald P, Pop C, Hakem R, Salvesen GS & Green DR (2011) Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* **471**: 363-367
- Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T & Nagata S (1993) Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* **364**: 806-809
- Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, Lenardo MJ, Rieux-Laucat F, Siegel RM, Su HC, Teachey DT & others (2010) Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood* **116**: e35
- Olivera A & Spiegel S (1993) Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* **365**: 557-560
- Olsson M, Vakifahmetoglu H, Abruzzo PM, Högstrand K, Grandien A & Zhivotovsky B (2009) DISC-mediated activation of caspase-2 in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* **28**: 1949–1959

- Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ, Joseph MK, Kitada S, Korsmeyer SJ, Kunzer AR, Letai A, Li C, Mitten MJ, Nettekheim DG, Ng S, Nimmer PM, *et al.* (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **435**: 677-681
- Overholtzer M, Mailloux AA, Mouneimne G, Normand G, Schnitt SJ, King RW, Cibas ES & Brugge JS (2007) A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion. *Cell* **131**: 966-979
- Ozören N & El-Deiry WS (2002) Defining Characteristics of Types I and II Apoptotic Cells in Response to TRAIL. *Neoplasia* **4**: 551-557
- O' Reilly LA, Tai L, Lee L, Kruse EA, Grabow S, Fairlie WD, Haynes NM, Tarlinton DM, Zhang J-G, Belz GT, Smyth MJ, Bouillet P, Robb L & Strasser A (2009) Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature* **461**: 659-663
- Pan G (1997a) The Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL. *Science* **276**: 111-113
- Pan G (1997b) An Antagonist Decoy Receptor and a Death Domain-Containing Receptor for TRAIL. *Science* **277**: 815-818
- Papoff G, Hausler P, Eramo A, Pagano MG, Di Leve G, Signore A & Ruberti G (1999) Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 38241
- Park WS, Lee JH, Shin MS, Park JY, Kim HS, Lee JH, Kim YS, Lee SN, Xiao W, Park CH, Lee SH, Yoo NJ & Lee JY (2002) Inactivating mutations of the caspase-10 gene in gastric cancer. *Oncogene* **21**: 2919-2925
- Perrotta C, Bizzozero L, Cazzato D, Morlacchi S, Assi E, Simbari F, Zhang Y, Gulbins E, Bassi MT, Rosa P & Clementi E (2010) Syntaxin 4 Is Required for Acid Sphingomyelinase Activity and Apoptotic Function. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 40240-40251
- Perry DK, Carton J, Shah AK, Meredith F, Uhlinger DJ & Hannun YA (2000) Serine Palmitoyltransferase Regulates de Novo Ceramide Generation during Etoposide-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 9078
- Peter M, Budd R, Desbarats J, Hedrick S, Hueber A, Newell M, Owen L, Pope R, Tschopp J & Wajant H (2007) The CD95 Receptor: Apoptosis Revisited. *Cell* **129**: 447-450
- Peter ME, Legembre P & Barnhart BC (2005) Does CD95 have tumor promoting activities? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* **1755**: 25-36
- Phillips TA, Ni J, Pan G, Ruben SM, Wei YF, Pace JL & Hunt JS (1999) TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. *J. Immunol* **162**: 6053-6059
- Di Pietro R, Secchiero P, Rana R, Gibellini D, Visani G, Bemis K, Zamai L, Miscia S & Zauli G (2001) Ionizing radiation sensitizes erythroleukemic cells but not normal erythroblasts to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated cytotoxicity by selective up-regulation of TRAIL-R1. *Blood* **97**: 2596
- Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D & Ashkenazi A (1998) Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* **396**: 699-703
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A & Ashkenazi A (1996) Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 12687
- Plummer R, Attard G, Pacey S, Li L, Razak A, Perrett R, Barrett M, Judson I, Kaye S, Fox NL & others (2007) Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers. *Clinical Cancer Research* **13**: 6187
- Pockros PJ, Schiff ER, Shiffman ML, McHutchison JG, Gish RG, Afdhal NH, Makhviladze M, Huyghe M, Hecht D, Oltersdorf T & Shapiro DA (2007) Oral IDN-6556, an antiapoptotic caspase inhibitor, may lower aminotransferase activity in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **46**: 324-329
- Pop C, Timmer J, Sperandio S & Salvesen GS (2006) The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Molecular cell* **22**: 269-275
- Pop C, Fitzgerald P, Green DR & Salvesen GS (2007) Role of Proteolysis in Caspase-8 Activation and Stabilization †. *Biochemistry* **46**: 4398-4407
- Popa I, Therville N, Carpentier S, Levade T, Cuvillier O & Portoukalian J (2011) Production of Multiple Brain-Like Ganglioside Species Is Dispensable for Fas-Induced Apoptosis of Lymphoid Cells. *PLoS ONE* **6**: e19974
- Qin Y, Camoretti-Mercado B, Blokh L, Long CG, Ko FD & Hamann KJ (2002) Fas resistance of leukemic eosinophils is due to activation of NF-kappa B by Fas ligation. *J. Immunol* **169**: 3536-3544

- Ramage P, Cheneval D, Chvei M, Graff P, Hemmig R, Heng R, Kocher HP, Mackenzie A, Memmert K & Revesz L (1995) Expression, refolding, and autocatalytic proteolytic processing of the interleukin-1 beta-converting enzyme precursor. *J. Biol. Chem* **270**: 9378-9383
- Rao L, Perez D & White E (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *The Journal of cell biology* **135**: 1441
- Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GS & Pickup DJ (1992) Viral inhibition of inflammation: Cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1[beta] converting enzyme. *Cell* **69**: 597-604
- Reczek D, Schwake M, Schröder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, Brondyk W, Van Patten S, Edmunds T & Saftig P (2007) LIMP-2 Is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of β -Glucocerebrosidase. *Cell* **131**: 770-783
- Reid P & Holen I (2009) Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). *European journal of cell biology* **88**: 1–17
- Ren D, Tu H-C, Kim H, Wang GX, Bean GR, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ-D & Cheng EH-Y (2010) BID, BIM, and PUMA Are Essential for Activation of the BAX- and BAK-Dependent Cell Death Program. *Science* **330**: 1390-1393
- Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC & Salvesen GS (2001) Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 14250
- Restifo NP (2000) Not so Fas: re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nature medicine* **6**: 493
- Ricci JE, Muñoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Bailly-Maitre B, Perkins GA, Yadava N, Scheffler IE, Ellisman MH & Green DR (2004) Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* **117**: 773–786
- Riedl SJ, Fuentes-Prior P, Renatus M, Kairies N, Krapp S, Huber R, Salvesen GS & Bode W (2001) Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 14790
- Rieger J, Naumann U, Glaser T, Ashkenazi A & Weller M (1998) APO2 ligand: a novel lethal weapon against malignant glioma? *FEBS letters* **427**: 124–128
- Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A & De Villartay JP (1995) Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* **268**: 1347
- Rigaud S, Fondanèche M-C, Lambert N, Pasquier B, Mateo V, Soulas P, Galicier L, Le Deist F, Rieux-Laucat F, Revy P, Fischer A, de Saint Basile G & Latour S (2006) XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* **444**: 110-114
- Rodriguez I, Matsuura K, Ody C, Nagata S & Vassalli P (1996) Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. *The Journal of experimental medicine* **184**: 2067
- Rosen D, Li JH, Keidar S, Markon I, Orda R & Berke G (2000) Tumor immunity in perforin-deficient mice: a role for CD95 (Fas/APO-1). *The Journal of Immunology* **164**: 3229
- Rossin A, Kral R, Lounnas N, Chakraborty K, Mailfert S, Marguet D & Hueber AO (2010) Identification of a lysine-rich region of Fas as a raft nanodomain targeting signal necessary for Fas-mediated cell death. *Experimental cell research* **316**: 1513–1522
- Roth W, Isenmann S, Nakamura M, Platten M, Wick W, Kleihues P, Bähr M, Ohgaki H, Ashkenazi A & Weller M (2001) Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis. *Cancer research* **61**: 2759
- Rouvier E, Luciani MF & Golstein P (1993) Fas involvement in Ca²⁺-independent T cell-mediated cytotoxicity. *The Journal of experimental medicine* **177**: 195
- Rozhkova AV, Dmitrieva VG, Zhapparova ON, Sudarkina OY, Nadezhkina ES, Limborska SA & Dergunova LV (2011) Human sphingomyelin synthase 1 gene (SMS1): Organization, multiple mRNA splice variants and expression in adult tissues. *Gene*
- Ryan AE, Shanahan F, O'Connell J & Houston AM (2005) Addressing the « Fas counterattack » controversy: blocking fas ligand expression suppresses tumor immune evasion of colon cancer in vivo. *Cancer research* **65**: 9817
- Sabourdy F, Kedjour B, Sorli SC, Colié S, Milhas D, Salma Y & Levade T (2008) Functions of sphingolipid metabolism in mammals—lessons from genetic defects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1781**: 145–183
- Salma Y, Lafont E, Therville N, Carpentier S, Bonnafé M-J, Levade T, Génisson Y & Andrieu-Abadie N (2009) The natural marine anhydrophytosphingosine, Jaspine B, induces apoptosis in melanoma cells by interfering with ceramide metabolism. *Biochem. Pharmacol* **78**: 477-485
- Salmela L (2003) Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes & Development* **17**: 883-895

- Salvesen GS & Dixit VM (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 10964
- Samraj AK (2006) Loss of Caspase-9 Provides Genetic Evidence for the Type I/II Concept of CD95-mediated Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 29652-29659
- Santana P & others (1996) Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* **86**: 189-199
- Sawada M, Nakashima S, Banno Y, Yamakawa H, Takenaka K, Shinoda J, Nishimura Y, Sakai N & Nozawa Y (2000) Influence of Bax or Bcl-2 overexpression on the ceramide-dependent apoptotic pathway in glioma cells. *Oncogene* **19**: 3508-3520
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH & Peter ME (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal* **17**: 1675-1687
- Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH & Peter ME (1999) Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 22532
- Scarlatti F (2004) Ceramide-mediated Macroautophagy Involves Inhibition of Protein Kinase B and Up-regulation of Beclin 1. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 18384-18391
- Schneider P (2002) Identification of a New Murine Tumor Necrosis Factor Receptor Locus That Contains Two Novel Murine Receptors for Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL). *Journal of Biological Chemistry* **278**: 5444-5454
- Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A & Tschopp J (1998) Conversion of membrane-bound Fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *The Journal of experimental medicine* **187**: 1205
- Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, Holler N & Tschopp J (1997) TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF- κ B. *Immunity* **7**: 831-836
- Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Jakob M, Winoto-Morbach S, Held-Feindt J, Heinrich M, Merkel O, Ehrenschwender M, Adam D & others (2004) Compartmentalization of TNF Receptor 1 Signaling:: Internalized TNF Receptosomes as Death Signaling Vesicles. *Immunity* **21**: 415-428
- Schulte M, Reiss K, Lettau M, Maretzky T, Ludwig A, Hartmann D, De Strooper B, Janssen O & Saftig P (2007) ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death & Differentiation* **14**: 1040-1049
- Schwalm S, Döll F, Römer I, Bubnova S, Pfeilschifter J & Huwiler A (2008) Sphingosine kinase-1 is a hypoxia-regulated gene that stimulates migration of human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* **368**: 1020-1025
- Schwandner R, Wiegmann K, Bernardo K, Kreder D & Krönke M (1998) TNF receptor death domain-associated proteins TRADD and FADD signal activation of acid sphingomyelinase. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 5916
- Screaton GR, Mongkolsapaya J, Xu XN, Cowper AE, McMichael AJ & Bell JI (1997) TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Current Biology* **7**: 693-696
- Screpanti V, Wallin RP, Ljunggren HG & Grandien A (2001) A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *J. Immunol* **167**: 2068-2073
- Sebbagh M, Renvoizé C, Hamelin J, Riché N, Bertoglio J & Bréard J (2001) Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat. Cell Biol* **3**: 346-352
- Secchiero P (2003) TRAIL Promotes the Survival and Proliferation of Primary Human Vascular Endothelial Cells by Activating the Akt and ERK Pathways. *Circulation* **107**: 2250-2256
- Selzner M, Bielawska A, Morse MA, Rüdiger HA, Sindram D, Hannun YA & Clavien PA (2001) Induction of apoptotic cell death and prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer. *Cancer research* **61**: 1233
- Separovic D, Hanada K, Maitah MYA, Nagy B, Hang I, Tainsky MA, Kraniak JM & Bielawski J (2007) Sphingomyelin synthase 1 suppresses ceramide production and apoptosis post-photodamage. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **358**: 196-202
- Separovic D, Semaan L, Tarca AL, Awad Maitah MY, Hanada K, Bielawski J, Villani M & Luberto C (2008) Suppression of sphingomyelin synthase 1 by small interference RNA is associated with enhanced ceramide production and apoptosis after photodamage. *Exp. Cell Res* **314**: 1860-1868
- Sheridan JP (1997) Control of TRAIL-Induced Apoptosis by a Family of Signaling and Decoy Receptors. *Science* **277**: 818-821

- Shi Y (2004) Caspase Activation:: Revisiting the Induced Proximity Model. *Cell* **117**: 855–858
- Shimizu M, Fontana A, Takeda Y, Yagita H, Yoshimoto T & Matsuzawa A (1999) Induction of antitumor immunity with Fas/APO-1 ligand (CD95L)-transfected neuroblastoma neuro-2a cells. *The Journal of Immunology* **162**: 7350
- Shin MS, Kim HS, Kang CS, Park WS, Kim SY, Lee SN, Lee JH, Park JY, Jang JJ, Kim CW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ & Lee SH (2002) Inactivating mutations of CASP10 gene in non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **99**: 4094-4099
- Shin S, Lee Y, Kim W, Ko H, Choi H & Kim K (2005) Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *The EMBO Journal* **24**: 3532–3542
- Shinghal R, Scheller RH & Bajjalieh SM (1993) Ceramide 1-phosphate phosphatase activity in brain. *J. Neurochem* **61**: 2279-2285
- Siegel RM, Muppidi JR, Sarker M, Lobito A, Jen M, Martin D, Straus SE & Lenardo MJ (2004) SPOTS. *The Journal of cell biology* **167**: 735
- Siegel RM (2000) Fas Preassociation Required for Apoptosis Signaling and Dominant Inhibition by Pathogenic Mutations. *Science* **288**: 2354-2357
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T & others (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**: 309–319
- Siskind LJ (2005) Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **37**: 143–153
- Sohn D (2004) Caspase-8 Can Be Activated by Interchain Proteolysis without Receptor-triggered Dimerization during Drug-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 5267-5273
- Soria J-C, Smit E, Khayat D, Besse B, Yang X, Hsu C-P, Reese D, Wiezorek J & Blackhall F (2010) Phase 1b Study of Dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in Combination With Paclitaxel, Carboplatin, and Bevacizumab in Patients With Advanced Non-Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **28**: 1527-1533
- Spencer SL, Gaudet S, Albeck JG, Burke JM & Sorger PK (2009) Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature* **459**: 428-432
- Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH & Walczak H (2000) FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* **12**: 599–609
- Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA & Walczak H (2002) Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J* **21**: 4520-4530
- Sprong H, Kruihof B, Leijendekker R, Slot JW, van Meer G & van der Sluijs P (1998) UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase is a class I integral membrane protein of the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 25880
- Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y & others (2001) A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**: 112–116
- Stalder T, Hahn S & Erb P (1994) Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol* **152**: 1127-1133
- Steller EJA, Ritsma L, Raats DAE, Hoogwater FJH, Emmink BL, Govaert KM, Laoukili J, Borel Rinkes IHM, van Rheenen J & Kranenburg O (2011) The death receptor CD95 activates the cofilin pathway to stimulate tumour cell invasion. *EMBO Rep* **12**: 931-937
- Stennicke HR & Salvesen GS (1999) Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ* **6**: 1054-1059
- Stennicke HR, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM & Salvesen GS (1999) Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 8359
- Storr SJ, Carragher NO, Frame MC, Parr T & Martin SG (2011) The calpain system and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**: 364-374
- Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rosen-Wolff A, Peters AMJ, Sneller MC, Hallahan CW, Wang J & others (2001) The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* **98**: 194
- Suda T, Takahashi T, Golstein P & Nagata S (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* **75**: 1169-1178

- Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T & Nagata S (1997) Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *The Journal of experimental medicine* **186**: 2045
- Sugiura M (2002) Ceramide Kinase, a Novel Lipid Kinase. MOLECULAR CLONING AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 23294-23300
- Sun M, Ames KT, Suzuki I & Fink PJ (2006) The cytoplasmic domain of Fas ligand costimulates TCR signals. *J. Immunol* **177**: 1481-1491
- Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prévost MC & others (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *The Journal of experimental medicine* **192**: 571
- Suzuki K & Suzuki Y (1970) Globoid cell leucodystrophy (Krabbe's disease): deficiency of galactocerebroside β -galactosidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **66**: 302
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K & Takahashi R (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Molecular cell* **8**: 613-621
- Swanton C, Marani M, Pardo O, Warne PH, Kelly G, Sahai E, Elustondo F, Chang J, Temple J & Ahmed AA (2007) Regulators of Mitotic Arrest and Ceramide Metabolism Are Determinants of Sensitivity to Paclitaxel and Other Chemotherapeutic Drugs. *Cancer Cell* **11**: 498-512
- Ségui B, Cuvillier O, Adam-Klages S, Garcia V, Malagarie-Cazenave S, Lévêque S, Caspar-Bauguil S, Coudert J, Salvayre R, Krönke M & Levade T (2001) Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *J. Clin. Invest.* **108**: 143-151
- Tafesse FG, Huitema K, Hermansson M, van der Poel S, van den Dikkenberg J, Uphoff A, Somerharju P & Holthuis JCM (2007) Both sphingomyelin synthases SMS1 and SMS2 are required for sphingomyelin homeostasis and growth in human HeLa cells. *J. Biol. Chem* **282**: 17537-17547
- Taguchi Y, Kondo T, Watanabe M, Miyaji M, Umehara H, Kozutsumi Y & Okazaki T (2004) Interleukin-2-induced survival of natural killer (NK) cells involving phosphatidylinositol-3 kinase-dependent reduction of ceramide through acid sphingomyelinase, sphingomyelin synthase, and glucosylceramide synthase. *Blood* **104**: 3285
- Taha TA (2005) Tumor Necrosis Factor Induces the Loss of Sphingosine Kinase-1 by a Cathepsin B-dependent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 17196-17202
- Tait SWG, Parsons MJ, Llambi F, Bouchier-Hayes L, Connell S, Muñoz-Pinedo C & Green DR (2010) Resistance to Caspase-Independent Cell Death Requires Persistence of Intact Mitochondria. *Developmental Cell* **18**: 802-813
- Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T & Nagata S (1994) Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**: 969-976
- Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, Iwakura Y, Yagita H & Okumura K (2001) Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat. Med* **7**: 94-100
- Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H & Okumura K (2002) Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *The Journal of experimental medicine* **195**: 161
- Tanaka M, Itai T, Adachi M & Nagata S (1998) Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat. Med* **4**: 31-36
- Tanaka M, Suda T, Haze K, Nakamura N, Sato K, Kimura F, Motoyoshi K, Mizuki M, Tagawa S, Ohga S, Hatake K, Drummond AH & Nagata S (1996) Fas ligand in human serum. *Nat. Med* **2**: 317-322
- Tanaka M, Suda T, Takahashi T & Nagata S (1995) Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *The EMBO Journal* **14**: 1129
- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH & Goeddel DV (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**: 845-853
- Tecchio C, Huber V, Scapini P, Calzetti F, Margotto D, Todeschini G, Pilla L, Martinelli G, Pizzolo G, Rivoltini L & others (2004) IFN α -stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood* **103**: 3837
- Tepper AD, G R Boesen-de Cock J, de Vries E, Borst J & Van Blitterswijk WJ (1997) CD95/Fas-induced ceramide formation proceeds with slow kinetics and is not blocked by caspase-3/CPP32 inhibition. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 24308-24312
- Tepper AD, Ruurs P, Wiedmer T, Sims PJ, Borst J & Van Blitterswijk WJ (2000) Sphingomyelin hydrolysis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology. *The Journal of Cell Biology* **150**: 155

- Tepper AD, De Vries E, Van Blitterswijk WJ & Borst J (1999) Ordering of ceramide formation, caspase activation, and mitochondrial changes during CD95- and DNA damage-induced apoptosis. *Journal of Clinical Investigation* **103**: 971–978
- Tepper AD (2000) Glucosylceramide Synthase Does Not Attenuate the Ceramide Pool Accumulating during Apoptosis Induced by CD95 or Anti-cancer Regimens. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 34810–34817
- Tepper CG, Jayadev S, Liu B, Bielawska A, Wolff R, Yonehara S, Hannun YA & Seldin MF (1995) Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 8443
- Ternes P (2002) Identification and Characterization of a Sphingolipid Delta 4-Desaturase Family. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 25512–25518
- Tewari M & Dixit VM (1995) Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J. Biol. Chem* **270**: 3255–3260
- Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schröter M, Scaffidi C, Kramer PH, Peter ME & Tschopp J (1997) Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**: 517–521
- Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**: 1456–1462
- Thon L, Mathieu S, Kabelitz D & Adam D (2006) The murine TRAIL receptor signals caspase-independent cell death through ceramide. *Experimental cell research* **312**: 3808–3821
- Thon L, Mohlig H, Mathieu S, Lange A, Bulanova E, Winoto-Morbach S, Schütze S, Bulfone-Paus S & Adam D (2005) Ceramide mediates caspase-independent programmed cell death. *The FASEB Journal* **19**: 1945
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR & Aunins J (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**: 768–774
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP & others (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 17907
- Tinel A & Tschopp J (2004) The PIDDosome, a Protein Complex Implicated in Activation of Caspase-2 in Response to Genotoxic Stress. *Science* **304**: 843–846
- Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM & Kramer PH (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* **245**: 301
- Trauzold A, Siegmund D, Schniewind B, Sipos B, Egberts J, Zorenkov D, Emme D, Röder C, Kalthoff H & Wajant H (2006) TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* **25**: 7434–7439
- Trauzold A, Schmiedel S, Sipos B, Wermann H, Westphal S, Röder C, Klapper W, Arlt A, Lehnert L, Ungefroren H, Johannes F-J & Kalthoff H (2003) PKC μ prevents CD95-mediated apoptosis and enhances proliferation in pancreatic tumour cells. *Oncogene* **22**: 8939–8947
- Trencia A (2004) Omi/HtrA2 Promotes Cell Death by Binding and Degrading the Anti-apoptotic Protein ped/pea-15. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 46566–46572
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E & Croce CM (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **228**: 1440–1443
- Vacaru AM, Tafesse FG, Ternes P, Kondylis V, Hermansson M, Brouwers JFHM, Somerharju P, Rabouille C & Holthuis J (2009) Sphingomyelin synthase-related protein SMSr controls ceramide homeostasis in the ER. *The Journal of Cell Biology* **185**: 1013
- Varfolomeev E (2005) Molecular Determinants of Kinase Pathway Activation by Apo2 Ligand/Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 40599–40608
- Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O & others (1998) Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* **9**: 267–276
- Vaux DL, Cory S & Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**: 440–442
- Veldman RJ, Mita A, Cuvillier O, Garcia V, Klappe K, Medin JA, Campbell JD, Carpentier S, Kok JW & Levade T (2003) The absence of functional glucosylceramide synthase does not sensitize melanoma cells for anticancer drugs. *The FASEB Journal*: 210531

- Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W & Vandenabeele P (1998a) Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *The Journal of experimental medicine* **187**: 1477
- Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, Van de Craen M, Declercq W, Fiers W & Vandenabeele P (1998b) Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *The Journal of experimental medicine* **188**: 919
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ & Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**: 43–53
- Villani M, Subathra M, Im Y-B, Choi Y, Signorelli P, Del Poeta M & Luberto C (2008) Sphingomyelin synthases regulate production of diacylglycerol at the Golgi. *Biochem. J* **414**: 31-41
- Vincenz C & Dixit VM (1997) Fas-associated death domain protein interleukin-1beta-converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling. *J. Biol. Chem* **272**: 6578-6583
- Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG, Garland WA, Lu Y, Yu S, Hall HS & others (2006) Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* **9**: 225–238
- Voelkel-Johnson C, Hannun YA & El-Zawahry A (2005) Resistance to TRAIL is associated with defects in ceramide signaling that can be overcome by exogenous C6-ceramide without requiring down-regulation of cellular FLICE inhibitory protein. *Molecular cancer therapeutics* **4**: 1320
- Wagner KW (2004) Caspase-2 Can Function Upstream of Bid Cleavage in the TRAIL Apoptosis Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 35047-35052
- Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, Lawrence DA, Pitti RM, Lancaster K, Lee D, von Goetz M, Yee SF, Totpal K, Huw L, Katta V, Cavet G, Hymowitz SG, Amler L & Ashkenazi A (2007) Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat Med* **13**: 1070-1077
- Wajant H, Moosmayer D, Wüest T, Bartke T, Gerlach E, Schönherr U, Peters N, Scheurich P & Pfizenmaier K (2001) Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene* **20**: 4101-4106
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC & Lynch DH (1999) Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med* **5**: 157-163
- Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA & others (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *The EMBO Journal* **16**: 5386–5397
- Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM & Lenardo MJ (2001) Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 13884
- Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FKM, Dale J, Sneller M, Yao X, Puck JM, Straus SE & Lenardo MJ (1999) Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* **98**: 47–58
- Wang TTY & Jeng J (2000) Coordinated regulation of two TRAIL-R2/KILLER/DR5 mRNA isoforms by DNA damaging agents, serum and 17 β -estradiol in human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* **61**: 87–96
- Wang X, Rao RP, Kosakowska-Cholody T, Masood MA, Southon E, Zhang H, Berthet C, Nagashim K, Veenstra TK, Tessarollo L & others (2009) Mitochondrial degeneration and not apoptosis is the primary cause of embryonic lethality in ceramide transfer protein mutant mice. *The Journal of Cell Biology* **184**: 143
- Watanabe M, Kitano T, Kondo T, Yabu T, Taguchi Y, Tashima M, Umehara H, Domae N, Uchiyama T & Okazaki T (2004) Increase of nuclear ceramide through caspase-3-dependent regulation of the « sphingomyelin cycle » in Fas-induced apoptosis. *Cancer research* **64**: 1000
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA & Nagata S (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**: 314-317
- Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB & Korsmeyer SJ (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes & development* **14**: 2060
- Wei MC (2001) Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science* **292**: 727-730

- Wen J, Ramadevi N, Nguyen D, Perkins C, Worthington E & Bhalla K (2000) Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells. *Blood* **96**: 3900
- Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, Debatin KM & Krammer PH (1995) Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* **375**: 497-500
- White-Gilbertson S, Mullen T, Senkal C, Lu P, Ogretmen B, Obeid L & Voelkel-Johnson C (2009) Ceramide synthase 6 modulates TRAIL sensitivity and nuclear translocation of active caspase-3 in colon cancer cells. *Oncogene* **28**: 1132-1141
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA & others (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *immunity* **3**: 673-682
- Wilkinson JC, Cepero E, Boise LH & Duckett CS (2004) Upstream regulatory role for XIAP in receptor-mediated apoptosis. *Molecular and cellular biology* **24**: 7003
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM & Huang DCS (2007) Apoptosis Initiated When BH3 Ligands Engage Multiple Bcl-2 Homologs, Not Bax or Bak. *Science* **315**: 856-859
- Wu GS, Burns TF, Zhan Y, Alnemri ES & El-Deiry WS (1999) Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer research* **59**: 2770
- Wu J, Zhou T, Zhang J, He J, Gause WC & Mountz JD (1994) Correction of accelerated autoimmune disease by early replacement of the mutated lpr gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MRL-lpr/lpr mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 2344
- Wyllie AH, Kerr JF & Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol* **68**: 251-306
- Xia P, Gamble JR, Wang L, Pitson SM, Moretti PAB, Wattenberg BW, D'Andrea RJ & others (2000) An oncogenic role of sphingosine kinase. *Current Biology* **10**: 1527-1530
- Xu J, Yeh CH, Chen S, He L, Sensi SL, Canzoniero LMT, Choi DW & Hsu CY (1998) Involvement of de novo ceramide biosynthesis in tumor necrosis factor- α /cycloheximide-induced cerebral endothelial cell death. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 16521
- Yamaoka S, Miyaji M, Kitano T, Umehara H & Okazaki T (2004) Expression cloning of a human cDNA restoring sphingomyelin synthesis and cell growth in sphingomyelin synthase-defective lymphoid cells. *J. Biol. Chem* **279**: 18688-18693
- Yamashita T, Wada R, Sasaki T, Deng C, Bierfreund U, Sandhoff K & Proia RL (1999) A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 9142
- Yamin TT, Ayala JM & Miller DK (1996) Activation of the native 45-kDa precursor form of interleukin-1-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 13273
- Yang Y (2000) Ubiquitin Protein Ligase Activity of IAPs and Their Degradation in Proteasomes in Response to Apoptotic Stimuli. *Science* **288**: 874-877
- Yang Z, Khoury C, Jean-Baptiste G & Greenwood MT (2006) Identification of mouse sphingomyelin synthase 1 as a suppressor of Bax-mediated cell death in yeast. *FEMS Yeast Res* **6**: 751-762
- Yano M, Watanabe K, Yamamoto T, Ikeda K, Senokuchi T, Lu M, Kadomatsu T, Tsukano H, Ikawa M, Okabe M, Yamaoka S, Okazaki T, Umehara H, Gotoh T, Song W-J, Node K, Taguchi R, Yamagata K & Oike Y (2010) Mitochondrial Dysfunction and Increased Reactive Oxygen Species Impair Insulin Secretion in Sphingomyelin Synthase 1-null Mice. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 3992-4002
- Yeh W (1998) FADD: Essential for Embryo Development and Signaling from Some, But Not All, Inducers of Apoptosis. *Science* **279**: 1954-1958
- Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA & Korsmeyer SJ (1999) Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* **400**: 886-91
- Yonehara S, Ishii AI & Yonehara M (1989) A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *The Journal of experimental medicine* **169**: 1747
- Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM & Mak TW (1998) Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* **94**: 739-750
- Youle RJ & Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**: 47-59

- Yu L (2004) Regulation of an ATG7-beclin 1 Program of Autophagic Cell Death by Caspase-8. *Science* **304**: 1500-1502
- Yuan J & Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* **407**: 802–809
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM & Horvitz HR (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 [beta]-converting enzyme. *Cell* **75**: 641–652
- Yue HH, Diehl GE & Winoto A (2004) Loss of TRAIL-R does not affect thymic or intestinal tumor development in p53 and adenomatous polyposis coli mutant mice. *Cell Death Differ* **12**: 94-97
- Zerafa N, Westwood JA, Cretney E, Mitchell S, Waring P, Iezzi M & Smyth MJ (2005) Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies. *The Journal of Immunology* **175**: 5586
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J & Korsmeyer SJ (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-XL. *Cell* **87**: 619–628
- Zhang D-W, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu B-J, Lin S-C, Dong M-Q & Han J (2009) RIP3, an Energy Metabolism Regulator That Switches TNF-Induced Cell Death from Apoptosis to Necrosis. *Science* **325**: 332-336
- Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G & Spiegel S (1991) Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *The Journal of cell biology* **114**: 155
- Zhang H, Zhou X, McQuade T, Li J, Chan FK-M & Zhang J (2011) Functional complementation between FADD and RIP1 in embryos and lymphocytes. *Nature* **471**: 373-376
- Zhang J, Alter N, Reed JC, Borner C, Obeid LM & Hannun YA (1996) Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 5325
- Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH & Winoto A (1998) Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* **392**: 296-299
- Zhang XD, Borrow JM, Zhang XY, Nguyen T & Hersey P (2003) Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria. *Oncogene* **22**: 2869-2881
- Zhang Y (2001) Involvement of the Acid Sphingomyelinase Pathway in UVA-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 11775-11782
- Zhou H, Summers SA, Birnbaum MJ & Pittman RN (1998) Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 16568
- Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR & Thompson CB (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes & development* **15**: 1481
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A & Wang X (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

La mort cellulaire par apoptose est un mécanisme effecteur de la réponse immunitaire anti-tumorale. La liaison de ligands, dont TRAIL et CD95L, produits par des cellules immunitaires, sur des récepteurs de mort (DR pour Death Receptor), exprimés par les cellules tumorales, permet l'induction de l'apoptose. Ceci met en jeu différents événements dont la formation du DISC (Death Inducing Signalling Complex) et l'activation des caspases. De plus, le taux intracellulaire de céramide, un sphingolipide pro-apoptotique, augmente au cours de cette signalisation. L'objectif de cette thèse a été de clarifier le rôle des caspases initiateuses et du céramide dans l'apoptose induite par CD95L et TRAIL. Le rôle causal de la caspase 10, caspase initiateuse, dans l'induction de mort par CD95L est controversé. Nos travaux indiquent que cette protéase est impliquée dans la mort induite par CD95L en présence ou non de zVAD-fmk, un inhibiteur des caspases. Par ailleurs, nous montrons que la sphingomyéline synthase 1 (SMS1), qui synthétise de la sphingomyéline à partir de céramide, est inhibée de façon caspase-dépendante dans la signalisation de CD95. La SMS1 module l'induction de l'apoptose en réponse à CD95L et TRAIL. Ainsi, la surexpression de la SMS1 confère une protection vis-à-vis de la mort induite par ces ligands, tandis que la diminution de son expression sensibilise des cellules cancéreuses. Ce rôle protecteur dépendrait de la modulation de la formation du DISC et de la voie apoptotique mitochondriale. L'inhibition de cette enzyme pourrait donc permettre de sensibiliser des cellules cancéreuses à la mort induite par des agonistes des DR en modulant plusieurs étapes de l'apoptose.

Apoptotic cell death is an effector mechanism involved in immune responses, and, particularly in anti-tumoral immune response. Binding of ligands, such as TRAIL and CD95L, which are produced by immune cells, on DR (Death Receptors) expressed by tumor cells, induces apoptosis. This involves, in particular, DISC (Death Inducing Signalling Complex) formation and caspases activation. Moreover, an increase of intracellular level of ceramide, a pro-apoptotic sphingolipid, has been observed during this signalling and might be involved in cell death induction. The aim of this PhD was to clarify initiator caspases and ceramide roles in CD95L and TRAIL induced apoptosis. Initiator caspase 10 involvement in CD95L-induced cell death is still controversial. Our results indicate that this protease is indeed involved in CD95L-induced cell death as well as in CD95L induced cell death in the presence of zVAD-fmk, a caspase inhibitor. Moreover, we show that sphingomyelin synthase 1 (SMS1), which is responsible for the synthesis of sphingomyelin from ceramide, is inhibited in CD95 signalling, in a caspase-dependent way, and more precisely in a caspase-8-dependent way. SMS1 could modulate CD95L- and TRAIL-induced cell death. Indeed, SMS1 overexpression is protective against CD95L- and TRAIL- induced cell death, whereas down-regulating SMS1 by RNA interference sensitizes cancer cells. Our results point out that SMS1 protective role might depend on DISC formation and apoptotic mitochondrial pathway modulations. Sphingomyelin synthesis inhibition might therefore be an original way to sensitize cancer cells towards DR agonists *via* putative apoptotic signalling modulations at several steps.

Mots clés : Récepteurs de mort, Caspases, Cancérologie, Céramide, Sphingomyéline, CD95, Apoptose, TRAIL