

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n°1710

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences de la vie et de la Santé

Option : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 22 Juin 2010

par

Mathieu PIZON

Né le 13 Novembre 1982 à La Rochelle

**L'inhibition de la voie Phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/AKT
induit un signal apoptotique via la redistribution du récepteur de
mort CD95 dans les radeaux lipidiques**

Membres du Jury

M^r BALTZ Théo, *Professeur, Université Bordeaux II*

M^r MICHEAU Olivier, *Chargé de recherche INSERM, Université de Bourgogne*

M^r SEGUI Bruno, *Maître de conférences, Université Paul Sabatier, Toulouse III*

M^{me} THERET Nathalie, *Directrice de Recherche INSERM, Université de Rennes I*

M^r JUIN Philippe, *Directeur de Recherche INSERM, Université de Nantes*

M^r LEGEMBRE Patrick, *Chargé de recherche INSERM, Université de Bordeaux II*

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n°1710

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences de la vie et de la Santé

Option : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 22 Juin 2010

par

Mathieu PIZON

Né le 13 Novembre 1982 à La Rochelle

**L'inhibition de la voie Phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/AKT
induit un signal apoptotique via la redistribution du récepteur de
mort CD95 dans les radeaux lipidiques**

Membres du Jury

M^r BALTZ Théo, *Professeur, Université Bordeaux II*

M^r MICHEAU Olivier, *Chargé de recherche INSERM, Université de Bourgogne*

M^r SEGUI Bruno, *Maître de conférences, Université Paul Sabatier, Toulouse III*

M^{me} THERET Nathalie, *Directrice de Recherche INSERM, Université de Rennes I*

M^r JUIN Philippe, *Directeur de Recherche INSERM, Université de Nantes*

M^r LEGEMBRE Patrick, *Chargé de recherche INSERM, Université de Bordeaux II*

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse

« *Pa kapab' lé mor san éséyé* »

Proverbe de l'Ile de la Réunion

Remerciements

Je souhaite tout d'abord adresser tous mes remerciements aux membres du jury :

A M^r le Professeur Théo Baltz pour avoir accepté de présider ce jury, vous m'avez donné goût à l'Immunologie, et je vous en suis plus que reconnaissant. Merci pour vos conseils également, après avoir pris quelques murs avec Patrick, j'ai arrêté plus ou moins de « foncer »...

A M^r Olivier Micheau et M^r Bruno Ségui, d'avoir accepté de prendre le temps de juger ce travail.

A M^{me} Nathalie Theret et M^r Philippe Juin, pour avoir accepté d'être les examinateurs de ma thèse.

Je remercie mon directeur de thèse, Patrick Legembre, de m'avoir accueilli dans son équipe, de m'avoir formé depuis ma Maîtrise, et de m'avoir soutenu (même de façon sauvage) tout au long de ce parcours. Je salue sa disponibilité, ses compétences scientifiques et sa rigueur, qui m'ont permis de me dépasser sur le plan scientifique, mais également humain. Merci !

Un grand merci au Professeur Jean-François Moreau, pour les conversations scientifiques et autres, que nous avons pu partager. Merci pour votre disponibilité, votre écoute, et votre soutien dans différents domaines.

Je tiens également à remercier le Professeur Patrick Blanco, pour son soutien inconditionnel pour mes futurs projets, sa disponibilité et son écoute. Si un jour je peux rendre la pareille...

Merci à l'ensemble des membres du laboratoire pour leur accueil, leur soutien, leur disponibilité et pour certains leur humour, en particulier :

Sophie, pour tes connaissances, nos crises de rire/folie sous la hotte, nos chansons, le rhum de ton mari... ce fut un plaisir de travailler avec toi toutes ces années ! Mais souviens-toi : « Call me Lawwwwrence »

Ben, pour toute l'aide que tu m'as apporté durant cette thèse, pour le complément de formation que tu m'as donné, nos différentes discussions scientifiques et autres... Tu m'as énormément aidé, merci !!!!!!!

Gwen, pour les moments de rigolades pendant le passage de tes 42 plaques 96 puits pendant le week end, et le sopalin Trollesque...

Julie, Charlotte et Franck, pour vos conseils et votre disponibilité et votre gentillesse.

Vincent (Ex-Mister cytométrie), François (dit l'ancêtre), pour nos discussions scientifiques et autres...

Sonia, Omar, Flo, Walid, Cécile, Isa, Aurélie, Bichon, Christel, Giulia, et Séverine pour votre bonne humeur, votre fraîcheur et votre gentillesse.

Annie, merci pour ton soutien secrétairesque, mais surtout pour nos discussions...

Je tiens à remercier Patrick Moreau et Michel Castroviejo pour l'aide scientifique qu'ils m'ont apporté pendant une partie de mon travail.

Merci à tous mes amis, pour leur patience, malgré mon absence depuis 4ans, leur soutien, et tout simplement leur amitié.

A ma famille en France, Mamie Juju, Mamie Denise et Papi Louis, Jean-Baptiste, Alain, Annie, Véronique.

A mon band dalon la Réunion : Nico, Manu, Rudolphe (et son ti famille), Magamachin (gout' a nou mexicanos !), mi pens a zot souven, zot y mank a moin, mé nou retrouv dan pe de ten !!!

Egalement ma famille Réunionnaise, Tatïe Suzie, Jean-Claude, Tatïe « Mme Lorion » Gislaine (en espérant que ça aille mieux), Tatïe « Mairaine » Lorion et Nanet, Nicole et Fred, et Elodie (va bosser !!!), et Tonton Paul.

A mes amis Ostéopathes, qui m'ont supporté, soutenu malgré les absences, et pour tous ces supers moments partagés... merci à Adri, Tonj, Soso, Rico, Marie, le Vinz, Annie, Loulou, Ben et Mel, Drick-C et le Prothésiste dentaire Titi !

Aux Gwada, Olivier et Julien (« it's a kind of magic... »)

A Olivier, pour son soutien pendant toutes ces années a la fac... "OOOOoooooh"

A Helene, et son pti Djeb, pour leur generosité et leur amitié.

Au bon vieux Pedro l'escroc, et Julie-Anne pour leur amitié de 10 ans.

A Jame, pour nos discussions philosophiques sur les girafes, et son amitié.

A Cardichon, pour le soutien mutuel, courage...

Aux amitiés plus récentes, Anne, Raff, Audrey, Cathy, Marion, Arnaud, pour votre gentillesse, votre bonne humeur, et les victoires au billard !

Merci à COOOoooooooooopine et son doudou (Aurelie et Alex), pour votre soutien, votre écoute, les chinois, les films pas toujours top, la geekerie, et les soirées mémorables !

INTRODUCTION 11

1. L'Apoptose	12
1.1. Définition.....	12
1.2. Caractéristiques morphologiques et voies d'induction	12
1.2.1. La voie extrinsèque	14
1.2.2. La voie intrinsèque.....	14
1.3. Apoptose et physiologie	15
1.3.1. Développement	15
1.3.2. Système Immunitaire	16
1.4. Apoptose et pathologies.....	18
1.5. Les autres morts cellulaires programmées	18
2. Le système apoptotique CD95/CD95L	20
2.1. La famille des récepteurs apoptotiques.....	20
2.2. Le récepteur CD95.....	21
2.2.1. Structure.....	21
2.2.1.1. Le gène	21
2.2.1.2. La protéine	22
2.2.1.3. Relation structure/fonction	23
2.2.2. Expression.....	25
2.2.2.1. Distribution et régulation	25
2.2.2.2. Epissages alternatifs.....	25
2.2.3. Fonctions physiologiques.....	26
2.2.3.1. Système immunitaire.....	26
2.2.3.2. Autres Rôles.....	26
2.3. Le ligand du CD95 : le CD95L.....	27
2.3.1. Structure.....	27
2.3.1.1. Le gène	27
2.3.1.2. La protéine	28
2.3.2. Expression.....	29
2.3.3. Fonctions physiologiques.....	29
2.3.3.1. Cytotoxicité.....	29
2.3.3.2. L'AICD	30
2.3.3.3. Notion de « privilège immun »	31
2.3.3.4. L'évasion immune.....	32
2.3.3.5. Implication dans l'inflammation.....	32
2.3.4. Molécules mimant les effets cytotoxiques du CD95L	33
2.3.4.1. Anticorps agonistes	33
2.3.4.2. CD95L recombinant	33
2.3.5. Anomalies et pathologies du système CD95/CD95L.....	34
2.3.5.1. Chez la souris	34
2.3.5.2. Chez l'Homme	35
3. La Transduction du signal CD95/CD95L.....	38
3.1. Les étapes membranaires.....	38
3.1.1. La formation du DISC	38

3.1.2.	La cascade d'activation des caspases	41
3.1.2.1.	<i>Classification</i>	41
3.1.2.2.	<i>Structure</i>	41
3.1.2.3.	<i>Les caspases initiatrices</i>	43
3.1.2.4.	<i>Les caspases effectrices</i>	45
3.1.2.4.1.	Mode d'action	45
3.1.2.4.2.	Substrats des caspases effectrices	45
3.2.	Voie intrinsèque : la mitochondrie	46
3.2.1.	Signaux déclencheurs.....	46
3.2.2.	La famille Bcl-2	48
3.2.3.	Mécanismes	49
3.3.	Classification des cellules en type I et type II.....	52
3.4.	Autres voies de signalisation déclenchées par CD95.....	54
3.4.1.	Les voies apoptotiques.....	54
3.4.1.1.	<i>La production de céramide</i>	54
3.4.1.2.	<i>L'activation des Jun N-terminal Kinase</i>	54
3.4.2.	La voie nécrotique	55
3.4.3.	Les voies n'induisant pas la mort cellulaire	56
3.4.3.1.	<i>L'activation de NF-κB</i>	56
3.4.3.2.	<i>La voie ERK</i>	57
3.4.3.3.	<i>La voie PI3K/Akt</i>	57
3.5.	Les inhibiteurs de l'apoptose	57
3.5.1.	Les molécules régulatrices d'origine cellulaire.....	57
3.5.1.1.	<i>c-FLIP</i>	57
3.5.1.2.	<i>Les IAPs</i>	60
3.5.1.3.	<i>La protéine PED/PEA-15</i>	60
3.5.2.	Les protéines virales	61
3.5.3.	Les peptides inhibiteurs	63
4.	Les microdomaines	63
4.1.	Caractéristiques	63
4.2.	Composition chimique.....	64
4.3.	Composition protéique	65
4.3.1.	Protéines glycosylphosphatidylinositol (GPI).....	65
4.3.2.	Protéines transmembranaires	65
4.3.3.	Messagers intracytoplasmiques.....	65
4.4.	Microdomaines et signal CD95	66
5.	La voie PI3K/Akt.....	67
5.1.	La famille des PI3Ks	67
5.1.1.	Les sous-unités catalytiques.....	67
5.1.2.	Les PI3Ks de classe I	67
5.1.2.1.	<i>La classe I_A</i>	68
5.1.2.2.	<i>La classe I_B</i>	68
5.1.3.	Les PI3Ks de classe II.....	69
5.1.4.	Les PI3Ks de classe III	69
5.1.5.	Activation et fonction des PI3K I _A	69
5.1.5.1.	<i>Activation</i>	69
5.1.5.2.	<i>Les fonctions</i>	71
5.1.6.	La régulation des PI3Ks I _A	71

5.1.6.1.	<i>Le complexe p85/p110</i>	71
5.1.6.2.	<i>La PI 3-phosphatase, PTEN</i>	72
5.1.6.3.	<i>La PI 5-phosphatase SHIP</i>	72
5.1.6.4.	<i>Les inhibiteurs chimiques</i>	73
5.2.	La kinase Akt.....	73
5.2.1.	Caractéristiques.....	73
5.2.2.	Activation d'Akt	74
5.2.2.1.	<i>Modèle d'activation d'Akt</i>	75
5.2.3.	La régulation d'Akt.....	75
5.3.	La voie PI3K/Akt et cancer	77
5.4.	La voie PI3K/Akt et le signal CD95.....	78
RESULTATS		80
Article 1		81
La voie phosphatidylinositol 3-kinase permet le maintien de CD95 en dehors des radeaux lipidiques		81
1)	Introduction.....	82
2)	Méthodologie générale.....	82
ARTICLE 1		84
3)	Principaux résultats	98
4)	Conclusion	101
Article 2		102
La voie PI3K/Akt protège les cellules tumorales du signal CD95 en empêchant leur distribution dans les radeaux lipidiques		102
1)	Introduction.....	103
2)	Méthodologie générale.....	103
ARTICLE 2		104
3)	Principaux résultats	136
4)	Conclusions.....	138
DISCUSSION GENERALE		139
ANNEXES		165

A ma mère, mon père et mon frère...

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AICD : Activation-Induced Cell Death
AIF : Apoptosis Inducing Factor
Akt : Protein kinase B (PKB)
ALPS : Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome
Apaf-1 : apoptotic protease activating factor-1
ARN : Acide ribonucléique
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
BCR : B cell receptor
Bid : BH3-interacting-domain death agonist
Bim : Bcl-2-interacting mediator of cell death
BH : Bcl-2 homology ou Bcr homology
BSA : bovine serum albumine
CAD : caspase-activated DNase
CARD : caspase recruitment domain
Caspases : cysteine-dependent aspartate specific proteases
CD : cluster of differentiation
Ced : cell death abnormal
CHX : cycloheximide
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV : cytomégalovirus
CPA : cellule présentatrice d'antigène
CRD : cysteine-rich domains
Crm A : cytokine response modifier A
CTX : Toxine cholérique
dATP : adénosine triphosphate déoxyribonucléotide
DAXX : death domain associated protein
DcR : decoy receptor
DD : death domain
DED : death effector domain
DFF : DNA fragmentation factor
Diablo/Smac : direct IAP binding protein with low pI

DISC : death inducing signaling complex
 DR : death receptor
 EGF : epidermal growth factor
 ERK : extracellular-signal regulated kinase
 ERM : Ezrin Radixin Moesin
 FADD : Fas associated protein with death domain
 FAK : focal adhesion kinase
 FAP-1 : Fas associated phosphatase 1
 FasL : Fas Ligand
 FITC : fluorescein isothiocyanate
 FLICE : FADD-like ICE
 FLIP : FLICE inhibitory protein, c-FLIP pour cellular-FLIP et v-FLIP pour viral-FLIP
 GAP : GTP-activating protein
 Gld : Generalized lymphoproliferative disease
 GM : monosialogangliosides
 GPI : glycosylphosphatidylinositol
 IAP : inhibitor of apoptosis
 ICE : interleukin 1- β converting enzyme
 Ig : Immunoglobuline
 IL : Interleukine
 JNK : Jun N-terminal Kinase
 Kb : kilo base
 KDa : kilo Dalton
 KO : Knock-Out
 LAT : linker for activation of T cell
 Lpr : Lymphoproliferation
 MAPK : mitogen activated protein kinase
 MEK : ERK kinase
 MMP : Matrix Metalloprotease
 M β CD : Méthyl- β -cyclodextrine
 mTOR : Mammalian target of Rapamycin
 NF κ B : nuclear factor -kappa B
 NGF : nerve growth factor
 NK : Natural killer
 NO : monoxyde d'azote
 PARP-1 : poly(ADP-ribose) polymérase-1
 PBL : peripheral blood lymphocytes

PBS : phosphate buffer saline
 PDK : phosphoinositide-dependent kinase
 PED/PEA15 : Phosphoprotein enriched in diabetes/astrocytes 15
 PI3K : phosphatidyl inositol 3-kinase
 PIP₂ : phosphatidyl inositol bisphosphate
 PIP₃ : phosphatidyl inositol triphosphate
 PIPLC : phosphatidyl inositol specific phospholipase C
 PKB : protéine kinase B (Akt)
 PKC : protéine kinase C
 PLAD : pre-ligand assembly domain
 PTEN : phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
 PTP : permeability transition pore
 PX : phox homology
 RBD : Ras binding domain
 RIP : receptor interacting protein
 SH : src homology
 SHIP : SH2-containing Inositol 5'-Phosphatase
 SMAC : supramolecular activation cluster
 SPOTS : signaling protein oligomerization transduction structures
 tBid : truncated BID
 TCR : T cell receptor
 TLCK : N-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone
 TNF : tumor necrosis factor
 TNF-R1 : récepteur au TNF
 TRADD : TNF-R1-Associated Death Domain
 TRAF : TNF-Receptor-Associated Factor
 TRAIL : tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand
 VDAC : voltage dependent anionic channel
 VIH : virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION

1. L'Apoptose

1.1. Définition

L'apoptose est une mort cellulaire programmée, qui joue un rôle capital dans tout organisme multicellulaire. En effet, sans apoptose, un être humain de 80 ans aurait 2 tonnes de moelle osseuse et de ganglions lymphatiques, et 16km d'intestin [1]. Cette mort cellulaire programmée est indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire et donc à la survie d'un être multicellulaire.

Apoptose vient du grec *apo* signifiant l'éloignement et de *ptosis* la chute. Ce terme est une métaphore associant « la chute des feuilles d'un arbre », aux corps apoptotiques se détachant d'un épithélium. Ce terme a été pour la première fois utilisé par Kerr, Wyllie et Curie en 1972, via leur étude morphologique de la mort cellulaire dans des épithéliums de rat [2].

1.2. Caractéristiques morphologiques et voies d'induction

On distingue l'apoptose des autres morts cellulaires programmées que sont la nécrose, l'autophagie, ou la cornification, via ses traits morphologiques [3]. En effet, l'apoptose se caractérise par un arrondissement des cellules, une réduction du volume cellulaire (pycnose), la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire (caryorrhexie), une modification des organelles cytoplasmiques, le bourgeonnement membranaire, et enfin la formation de corps apoptotiques par fragmentation cellulaire, qui vont être digérés par les cellules phagocytaires (figure 1).

On considère qu'il existe deux principales voies induisant l'apoptose : la voie extrinsèque, ou voie des récepteurs de mort, et la voie intrinsèque, ou voie mitochondriale.

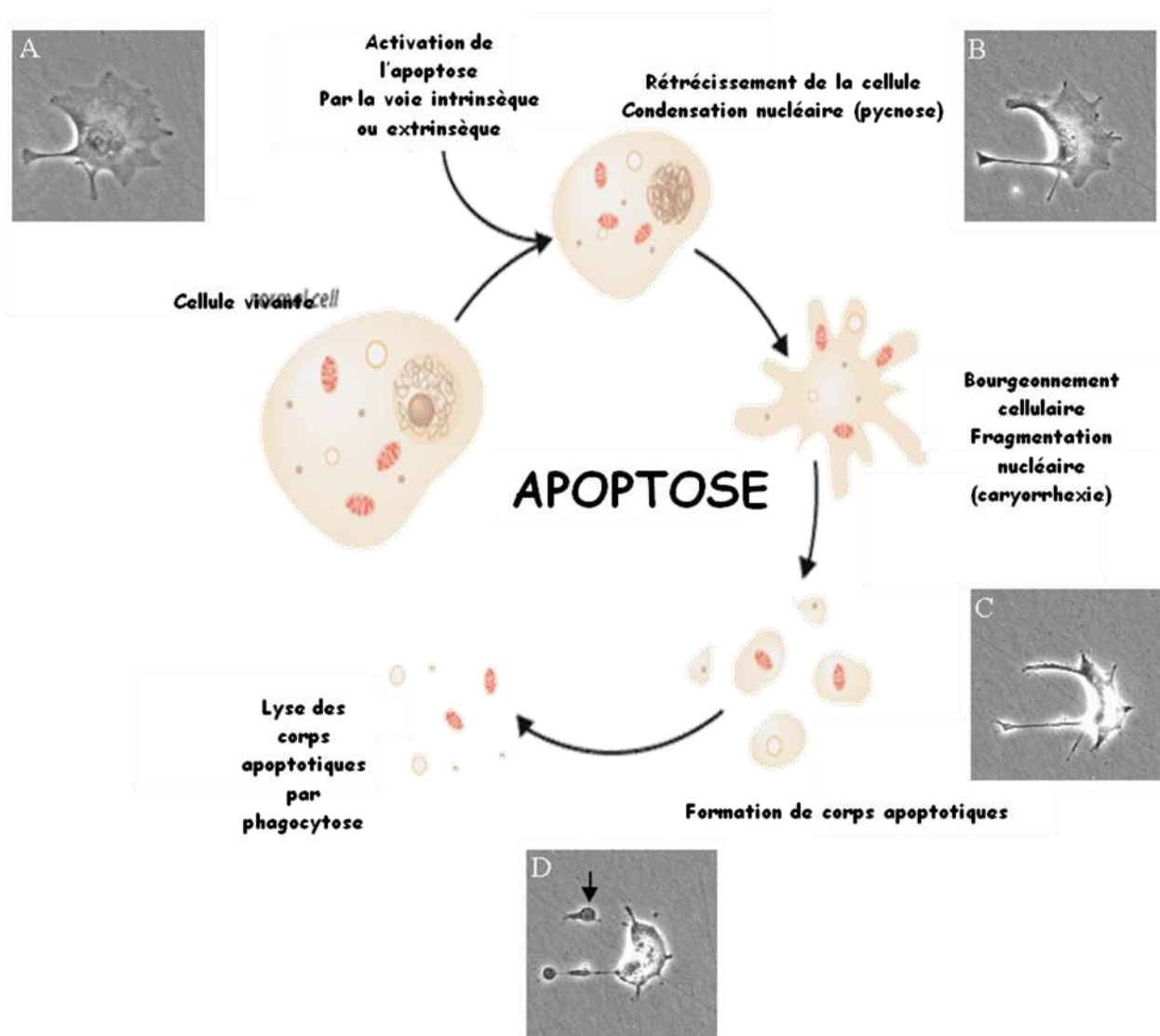


Figure 1: Etapes morphologiques de l'apoptose

D'après J.Philpott The Science Creative Quaterly, Issue 4, 2009 et Phil Dash, Apoptosis, (www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash).

1.2.1. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque est celle des récepteurs de mort, appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF (*Tumor necrosis factor*) (voir paragraphe 2.1). Lorsque le récepteur de mort est lié à son ligand, plusieurs complexes intracellulaires se forment, pour finalement aboutir à l'activation de protéases intra-cytoplasmiques, que sont les caspases (*cysteine-dependent aspartate specific proteases*). Ces caspases sont notamment responsables de la dégradation du cytosquelette comme de l'activation d'enzymes fragmentant l'ADN génomique.

1.2.2. La voie intrinsèque

Cette voie met principalement en jeu la mitochondrie, et est gouvernée par des protéines de la superfamille de Bcl-2. Différents stimuli sont à l'origine du déclenchement de cette voie. Ce sont par exemple le retrait de certaines cytokines, d'hormones, de certains facteurs de croissance, ou des lésions de l'ADN via l'activation de la protéine p53. Tous ces stimuli aboutissent à un changement de la membrane mitochondriale via la formation de pores. La perte de l'intégrité mitochondriale permet la libération de facteurs pro-apoptotiques normalement séquestrés dans l'espace intermembranaire, vers le cytosol (voir paragraphe 3.2). Dans le cytosol, ces facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome C, AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), la procaspase 9 ou encore Smac/Diablo, vont induire l'activation de caspases et la fragmentation de l'ADN.

Il est à noter qu'il existe des liens moléculaires entre ces deux voies.

1.3. Apoptose et physiologie

Les travaux de l'équipe du Dr Horvitz sur *Caenorhabditis elegans*, ont mis en évidence le caractère programmé de l'apoptose, et il a identifié les premiers acteurs moléculaires de ce signal [4]. *C.elegans* comprend 1090 cellules. Au cours de son développement, 131 vont mourir de façon programmée. L'étude de ces cellules destinées à mourir a permis de caractériser les premiers gènes impliqués dans la mort cellulaire programmée. Ces gènes de *C.elegans* ont pris la dénomination de *ced* pour *cell death abnormal* [5]. Ce rôle de l'apoptose dans le développement embryonnaire du nématode a été conservé au cours de l'évolution et en particulier pour l'Homme dans sa morphogénèse. L'apoptose est également impliquée dans la régulation de la quantité de cellules présentes dans l'organisme, autrement nommée homéostasie cellulaire.

1.3.1. Développement

L'apoptose joue un rôle prépondérant dans les différents processus du développement. Elle est notamment impliquée dans la morphogénèse, comme illustrée par son rôle essentiel dans la formation des espaces interdigitaux. Sous l'effet de protéines nommées *bone morphogenetic proteins* (BMP), les cellules du bourgeon des membres se différencient pour former les doigts ou meurent par apoptose pour la formation des espaces [6]. L'apoptose est aussi impliquée dans l'homéostasie cellulaire et l'élimination des cellules devenues inutiles, comme par exemple l'involution des glandes mammaires après le sevrage, l'élimination de neurones incapables d'établir de connections synaptiques [7], ou bien l'atrésie folliculaire, qui est la dégénérescence du follicule empêchant l'expulsion de l'ovule [8].

1.3.2. Système Immunitaire

Dans le système immunitaire, l'apoptose a différentes fonctions, et notamment dans les mécanismes de la tolérance, l'élimination des cellules indésirables et la résolution de la réponse immunitaire :

1.3.2.1. Sélection du répertoire immunitaire

- *Le lymphocyte T*

Chez les mammifères, l'éducation des lymphocytes T se déroule dans le thymus, qui est l'organe lymphoïde primaire. Au cours de la maturation thymique, 99% des thymocytes vont mourir par apoptose.

Après le réarrangement génique des chaînes β puis des chaînes α du récepteur à l'antigène, le TCR (*T cell receptor*), ces cellules vont subir une première sélection, la sélection positive. Pour passer cette sélection, le TCR $\alpha\beta$ doit reconnaître un antigène présenté par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de type I ou II des cellules épithéliales du cortex thymique. Les cellules ayant subi des réarrangements non fonctionnels de leurs gènes du TCR et celles qui sont incapables de lier le CMH avec une affinité suffisante vont être éliminées par apoptose. Cette étape a pour but de sélectionner les lymphocytes ayant des TCR capables de reconnaître le CMH exprimé par les cellules du soi. Parmi celles-ci, il en existe exprimant un TCR de forte affinité pour le complexe CMH/peptide douées d'autoimmunité.

Il existe ensuite une seconde sélection, la sélection négative. Les lymphocytes vont rentrer en contact avec des cellules présentatrices de l'antigène (CPA), de type cellules dendritiques, qui présentent les peptides du soi via leur CMH. Les lymphocytes reconnaissant le CMH/antigène du soi avec une forte affinité, seront éliminés par apoptose. Le récepteur de mort de CD95 était un candidat pour l'induction de l'apoptose lors de cette sélection négative, puisque les thymocytes expriment CD95, et les CPA expriment le CD95L. Mais l'utilisation de souris dont l'expression de CD95 est fortement diminué (*lpr*) ne possèdent aucune perturbation de leur sélection négative [9]. Cependant des études plus récentes ont montré l'implication du couple CD95/CD95L [10], et la voie intrinsèque de l'apoptose, avec la protéine BIM, un membre de la famille Bcl-2 [11], dans l'élimination des thymocytes lors de la sélection négative.

- *Le lymphocyte B*

Après leur différenciation dans la moelle osseuse, les lymphocytes B vont être éduqués dans les organes lymphoïdes secondaires. Au sein de ces sites, la sélection des lymphocytes B va se faire par deux types cellulaires, les lymphocytes T $CD4^+$, et les cellules dendritiques. A ce stade, les lymphocytes B naïfs expriment à leur surface des Immunoglobulines (Ig) que sont les IgM et les IgD, qui sont considérées comme les récepteurs à l'antigène des lymphocytes B (les BCRs pour *B-cell receptor*). Au repos, les lymphocytes B sont regroupés en follicules primaires, et leur activation va permettre la formation d'un follicule secondaire. Après avoir été en contact avec l'antigène, le lymphocyte B va présenter au sein de la zone extra-folliculaire (riche en lymphocytes T), le peptide antigénique via son CMH II. Le premier signal d'activation du Lymphocyte B est donné par les lymphocytes T $CD4^+$ qui reconnaissent le complexe CMH II/peptide antigénique, et permettent l'inhibition de la mort cellulaire programmée du lymphocyte B. Ce signal d'inhibition de la mort est transmis par le récepteur CD40 exprimé à la surface des lymphocytes B, qui est activé par son ligand (CD40L ou CD154) exprimé par les lymphocytes T activés.

Le second signal activateur est transmis via les cellules dendritiques. Après la première activation, les lymphocytes B activés vont proliférer, et exprimer de nouvelles Ig à travers un processus appelé commutation isotypique. Les cellules dendritiques présentent ensuite par le biais de complexes immuns (composés d'antigène piégé par des Ig), l'antigène, et vont sélectionner les lymphocytes B exprimant les Ig membranaires qui ont acquis une plus haute affinité pour l'antigène via le mécanisme d'hypermutation somatique. L'interaction lymphocyte B/cellule dendritique va induire un signal anti-apoptotique. Ainsi, les cellules B ayant des Ig moins affines pour l'antigène mourront rapidement par un processus de mort programmée [12].

1.3.2.2. *Elimination des cellules indésirables*

L'apoptose joue également un rôle dans l'élimination de cellules infectées et transformées. C'est notamment le cas des lymphocytes T cytotoxiques ainsi que des cellules Natural Killers (NK), qui sont capables d'induire directement l'apoptose de leur cible, soit via les récepteurs de mort, tel que CD95 qui est la principale voie utilisée [13], soit en utilisant le système perforine/granzyme, aboutissant dans les deux cas à l'activation des caspases.

1.3.2.3. *Résolution de la réponse immunitaire*

La mort cellulaire programmée permet aussi la contraction de la réponse immunitaire via l'élimination des lymphocytes activés par un phénomène nommé AICD (*Activation induced cell death*), contrôlant ainsi l'homéostasie du système immunitaire, ce phénomène prévenant un « emballement » des réponses immunitaires. Ainsi, à terme, il ne subsiste des expansions lymphocytaires plus que des lymphocytes mémoires en petit nombre.

1.4. Apoptose et pathologies

Des anomalies dans la régulation de l'apoptose sont à l'origine de différentes pathologies.

Le cancer est un exemple de dérégulation négative des processus apoptotiques. C'est le cas par exemple de certaines formes de lymphomes B, qui montrent une surexpression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 [14]. On retrouve également une inhibition de l'apoptose dans le développement de pathologies auto-immunes comme les syndromes ALPS (*Autoimmune lymphoproliferative syndrome*), où le récepteur CD95, le CD95L ou la caspase-10 sont mutés (voir paragraphe 2.3.5).

A l'inverse, on observe aussi une exacerbation du processus apoptotique dans certaines pathologies infectieuses comme le SIDA (*Syndrome d'immunodéficience acquise*), ou neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer.

1.5. Les autres morts cellulaires programmées

Il existe plusieurs types de mort cellulaires et nous nous concentrerons sur trois d'entre elles. En plus de l'apoptose, il a été rapporté la nécrose, l'autophagie, et la cornification (Tableau 1). La nécrose a longtemps été considérée comme accidentelle, mais des études récentes démontrent son caractère programmé [15, 16] (voir paragraphe 3.4.2).

Type de mort	Caractéristiques morphologiques	Notes
Nécrose	Gonflement du cytoplasme	La nécrose est généralement identifiée comme étant une mort n'ayant pas les caractéristiques morphologiques de l'apoptose ou de l'autophagie [16].
	Rupture de la membrane plasmique	
	Gonflement des organelles	
	Condensation modérée de la chromatine	
Autophagie	Pas de condensation de la chromatine	L'autophagie n'est pas seulement un mécanisme de mort cellulaire, elle peut également permettre la survie de la cellule [17].
	Une vacuolisation massive du cytoplasme	
	Accumulation de vacuoles autophagiques ayant une double membrane	
	Peu ou pas de phagocytose par les cellules phagocytaires in vivo	
Cornification	Elimination des organelles cytosoliques	La formation de "l'enveloppe cornifiée" ou kératinisation est spécifique de la peau, afin de former une barrière protectrice [18]. Cette cornification est spécifique des couches supérieures de l'épiderme, l'apoptose pouvant être induite au niveau de la lame basale de l'épiderme via par exemple, des UV ou irradiations.
	Modification de la membrane plasmique	
	Accumulation de lipides dans les granules F et L	
	Extrusion de lipides dans le milieu extracellulaire	
	Desquamation (perte des cornéocytes) par l'activation de protéases	

Tableau 1: Les autres morts cellulaires programmées

D'après G Kroemer et al, Cell Death and Differentiation 2009

2. Le système apoptotique CD95/CD95L

2.1. La famille des récepteurs apoptotiques

Les récepteurs apoptotiques appartiennent à la superfamille des récepteurs au TNF (*tumor necrosis factor*) / NGF (*nerve growth factor*) [17]. Elle comprend aussi des récepteurs impliqués dans les phénomènes de prolifération et de différenciation cellulaire comme le CD27 [18], le CD30 [19] et le CD40 [20].

Le groupe des récepteurs apoptotiques est défini par la capacité à induire un signal de mort cellulaire. Il comprend le récepteur CD95 (Apo1, Fas) [21], le TNFR-1 (*tumor necrosis factor receptor-1*) [22, 23], le DR3 (*death receptor 3*) [24, 25], le DR4, le DR5 [26], et le DR6 [27]. Ces récepteurs de mort cellulaire sont caractérisés par un domaine conservé dans leur région intracytoplasmique appelé le domaine de mort (DD pour *death domain*). Les membres de cette sous-famille sont représentés sur la figure 1. Il existe pour le TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*) deux récepteurs pièges connus fixant le ligand mais n'induisant aucun signal : le DcR2 (*decoy receptor 2*) [28] possède un domaine de mort tronqué et le DcR1 [29] est ancré à la membrane cellulaire par une structure glycosylphosphatidylinositol (GPI).

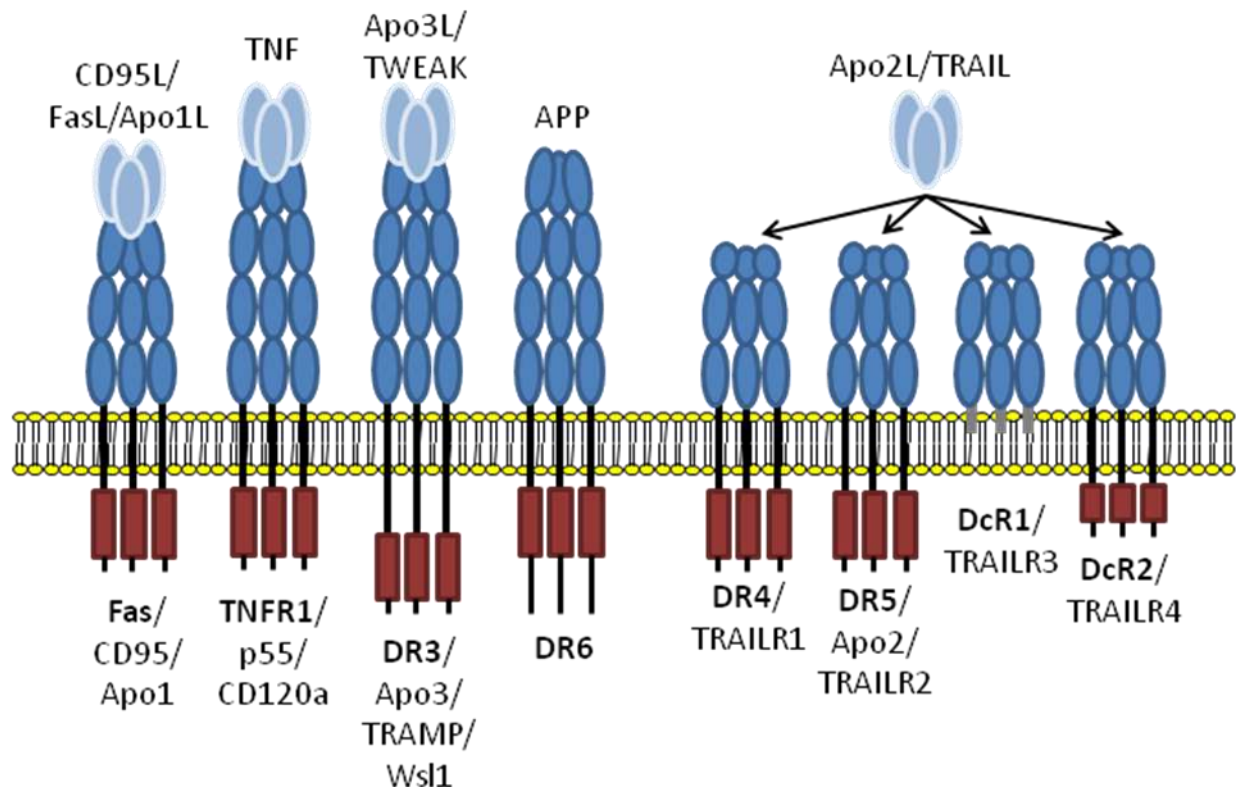


Figure 2: La sous famille apoptotique de la superfamille du récepteur au TNF avec leur ligand respectif.

Les ronds bleus représentent les CRD (*C*ysteine-*r*ich *D*omain) et les rectangles rouges sont les domaines de mort (DD) ; APP pour *α*-amyloid precursor protein. L'ancrage GPI est caractérisé par les traits épais gris. D'après Legembre, thèse de doctorat, 2002

2.2. Le récepteur CD95

2.2.1. Structure

2.2.1.1. Le gène

Le CD95 est nommé TNFRSF6 pour *tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*. Le gène du récepteur CD95 (gène APT1) est localisé sur le bras long du chromosome 10 humain (10q24.1) et sur le chromosome 19 murin orthologue [30]. Ce gène s'étend sur 26 kilobases chez l'Homme, et est constitué de 9 exons (figure 3 [31, 32]).

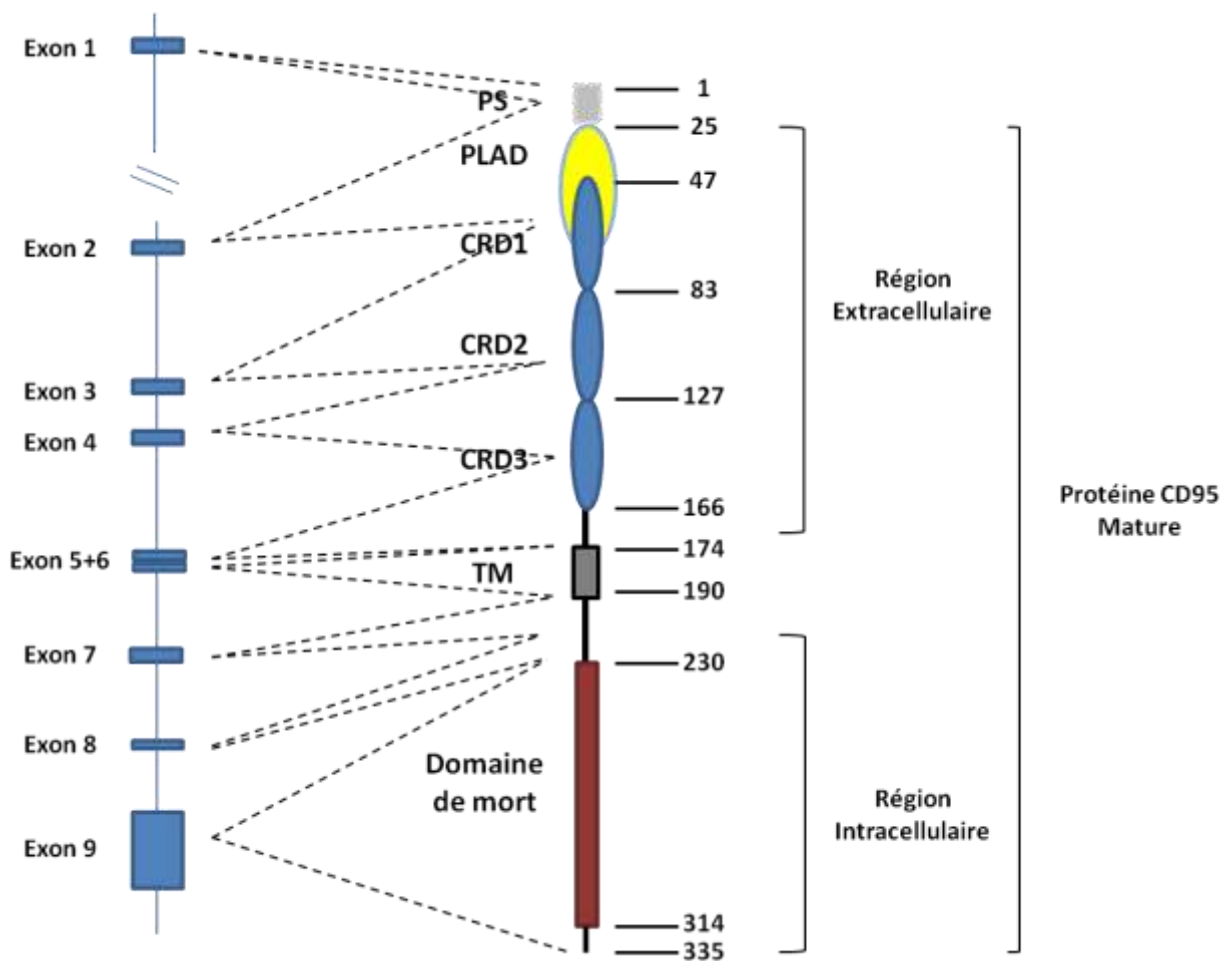


Figure 3: Représentation schématique du gène et de la protéine CD95.

La figure représente l'organisation des exons du gène APT1 et de la protéine CD95. Les chiffres indiqués sont les acides aminés. PS pour peptide signal ; PLAD pour *pre-ligand assembly domain* ; CRD pour *cystein-rich domain* ; TM pour domaine transmembranaire. D'après Cheng et al, *J Immunol*, 1995, Siegel et al, *Nat Immunol*, 2000 et The Universal Protein Resource (<http://www.uniprot.org/uniprot/P25445#ref14>).

2.2.1.2. La protéine

La protéine CD95 comprend 335 acides aminés, dont un peptide signal de 25 acides aminés (figure 3), et possède une masse moléculaire de 45 kDa. CD95 est une protéine transmembranaire de type I (région amino-terminale extracellulaire). Sa région extracellulaire comprend trois domaines riches en cystéines (CRDs pour *cysteine-rich domains*). Ces CRDs font environ 40 acides aminés de long et contiennent entre 1 et 3 ponts di-sulfures intramoléculaires. Le domaine de mort fait 84 acides aminés de long et est localisé dans la

région intra-cytoplasmique du récepteur (figure 3). Les domaines riches en cystéines sont communs à l'ensemble de la famille des récepteurs au TNF/NGF, tandis que le domaine de mort est spécifique de la sous-famille des récepteurs apoptotiques [33, 34](figure 3).

2.2.1.3. Relation structure/fonction

Les deux domaines de CD95 riches en cystéines CRD2 et CRD3, les plus proches de la membrane, sont nécessaires pour la fixation de CD95L [35, 36]. CD95, comme le TNFR, est trimérique et cette forme préexiste à la surface cellulaire en l'absence de leur ligand respectif [32, 37, 38]. En effet, ces récepteurs possèdent dans leur région extracellulaire une séquence PLAD (*preligand assembly domain*) essentielle à la trimérisation de la protéine par des liaisons homophiliques (figure 3). Ce domaine PLAD est localisé au niveau du CRD1 pour le récepteur CD95 (acides aminés 25 à 67). Ces résultats impliquent que la transmission du signal de mort s'effectue par un changement de conformation du récepteur trimérique sous l'effet du ligand. La modification de la conformation dans la région extracellulaire se répercute probablement par des modifications structurales dans la région intracellulaire qui vont permettre la transmission du signal. De plus, CD95 n'est pas pré-associé au repos avec les protéines intracellulaires permettant la transduction du signal de mort [39]; donc un rapprochement des trimères de CD95, afin de favoriser le contact des protéines transmettant le signal, ne semble pas être l'unique but du ligand. En effet, l'équipe de Riedl a proposé en 2008 un modèle permettant de démontrer ces changements de conformation et d'expliquer le rôle du CD95L [40] : la protéine CD95 existerait sous deux formes, une forme dite « fermée » qui est stable et majoritaire, et une forme « ouverte » qui serait instable, mais indispensable à la transmission du signal de mort. La proximité des trimères de CD95 permettrait la stabilisation de cette forme ouverte, par le biais d'interactions faibles au niveau de leur domaine de mort (figure 4). Ainsi, le CD95L induirait l'ouverture des trimères de CD95 de façon stable par leur rapprochement, permettant donc le recrutement des protéines transmettant le signal de mort en aval. Les microdomaines membranaires (voir paragraphe 4), sont connus pour leur capacité à concentrer dans un espace restreint des protéines membranaires ainsi que pour amplifier le signal CD95. Cette amplification du signal pourrait être due à la concentration de CD95 dans ces microdomaines, permettant ainsi la stabilisation de la forme ouverte des molécules CD95 via la proximité de leur domaine de mort.

Le DD de CD95 est une structure comprenant 6 hélices α amphipathiques et antiparallèles ne possédant aucune activité enzymatique propre. Lors de l'activation de CD95, le DD permet le recrutement, par une liaison homophile, de la protéine adaptatrice FADD (*Fas-associated protein with death domain*) qui possède une structure homologue DD [41, 42]. La troncation de la région carboxy-terminale (15 derniers acides aminés) de CD95 amplifie le signal apoptotique du récepteur, laissant à penser que cette séquence exerce un pouvoir inhibiteur [33]. En fait une phosphatase, FAP-1 (*CD95 associated phosphatase 1*), se lie à cette séquence au niveau des trois derniers acides aminés carboxy-terminaux de CD95 [43]. Pour certains auteurs, elle pourrait avoir un effet d'encombrement stérique qui empêcherait ainsi les DD de CD95 de s'auto-agréger [41] et de déclencher le signal de mort [44]. Plus récemment, il a été montré que FAP-1 pouvait réguler l'expression de CD95 à la membrane dans certains cancers [45]. D'autres molécules pourraient jouer un rôle similaire comme la protéine c-FLIP (*FADD-like Interleukine-1- β -converting-enzyme inhibitory protein*).

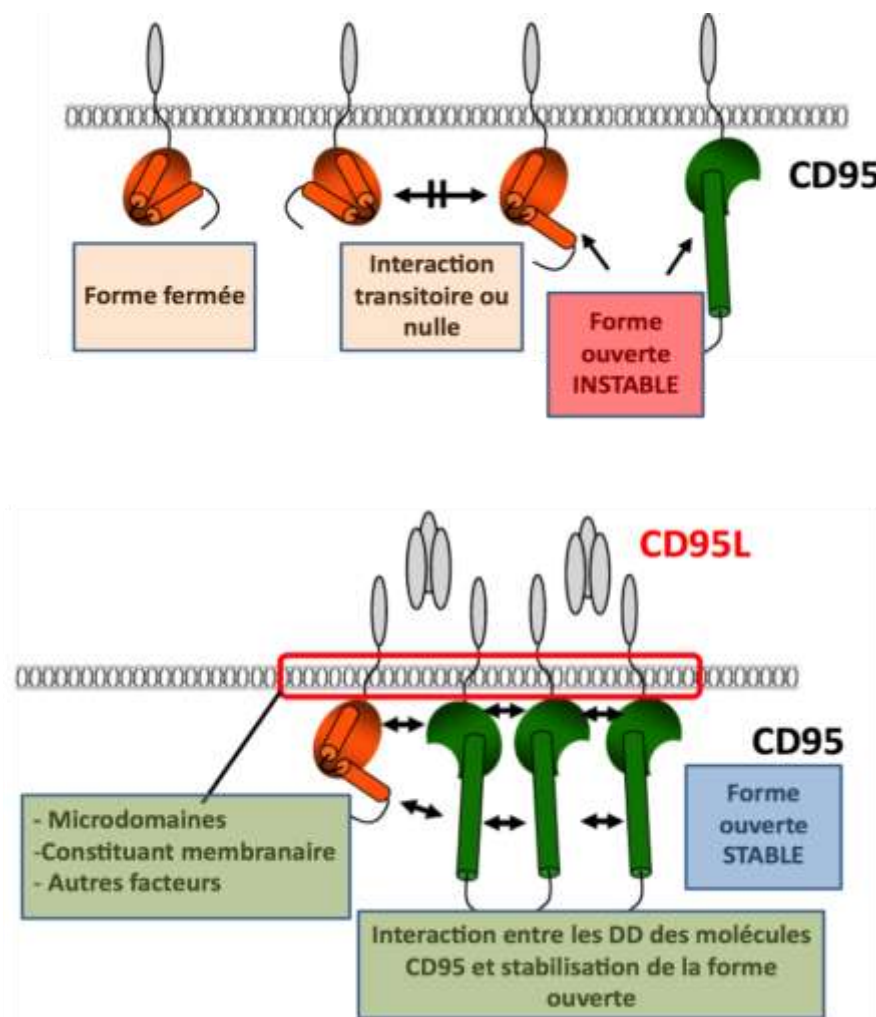


Figure 4: Modèle de transduction du signal CD95

D'après Scott et al, Nature 2009.

2.2.2. Expression

2.2.2.1. Distribution et régulation

L'expression de CD95 est ubiquitaire. Mais cette expression peut être modulée : elle est notamment augmentée au cours de l'activation des lymphocytes T par exemple, ou dans ces mêmes lymphocytes après infection par des virus tels que le virus de la leucémie T humaine (HTLV- 1), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) ou le virus d'Epstein-Barr (EBV) [46-48]. L'interféron- γ ou des cytokines impliquées dans le déclenchement du processus de l'inflammation telles que le TNF- α et l'IL1 β peuvent aussi augmenter ou induire l'expression de CD95 à la surface cellulaire [49]. On retrouve également une modulation de l'expression de CD95 au cours de la différenciation des cellules hématopoïétiques, qui est directement corrélée à la sensibilité à l'apoptose. Par exemple, les progéniteurs hématopoïétiques immatures possédant le marqueur cellulaire CD34 expriment très faiblement CD95, mais cette expression va graduellement augmenter au cours de la différenciation. L'augmentation de l'expression est sous la dépendance des cytokines précédemment citées [50].

2.2.2.2. Epissages alternatifs

En se basant sur l'observation que les thymocytes [51] et certaines cellules tumorales [52] exprimaient CD95 à leur surface mais étaient insensibles à la mort cellulaire déclenchée par le CD95L, deux groupes ont mis en évidence l'existence de différentes formes de CD95 produites par épissage alternatif et correspondant à des protéines tronquées ou solubles pouvant piéger le ligand. Les formes de CD95 tronquées vont ainsi jouer le rôle de dominant négatif, c'est le cas notamment du variant de CD95 ayant une délétion sur l'exon 7 et 8, qui possède une région intracytoplasmique tronquée [53]. Un autre variant du récepteur CD95 a été caractérisé et dans lequel l'exon 6, codant pour la partie transmembranaire, est éliminé. Le récepteur est donc sécrété, mais conserve une région intracellulaire intacte [54]. Ces protéines CD95 solubles inhibent ainsi le signal apoptotique déclenché par le CD95L ou des anticorps agonistes [52]. Huit variants ont été décrits à ce jour. Le CD95 soluble a été retrouvé en forte quantité dans le sérum au cours de certaines maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé [55].

2.2.3. Fonctions physiologiques

2.2.3.1. Système immunitaire

Le récepteur CD95 tient un rôle prépondérant dans l'homéostasie de la réponse immunitaire cellulaire mais aussi dans la composition du répertoire B par la sélection des lymphocytes B activés spécifiques de l'antigène.

Les lymphocytes T activés par la présentation antigénique sur-expriment CD95 à leur surface cellulaire et vont exprimer en même temps son ligand, le CD95L [56]. Cependant ces cellules restent insensibles à l'apoptose [57] due à la sur-expression concomitante de molécules anti-apoptotiques tels que c-FLIP [58] et Bcl-xL [59], et par l'activation de kinases comme les MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) qui empêchent le couplage de l'activation de CD95 avec les effecteurs de l'apoptose [60]. La mort cellulaire des lymphocytes T activés par l'antigène est primordiale afin d'éteindre la réponse immunitaire. Elle est nommée l'AICD pour *T cell-autonomous Activation-induced cell death*, et est dépendante de CD95 [61] (voir paragraphe 2.3.3.2). Plus récemment, il a été montré que CD95 jouait un rôle dans l'élimination de cellules T double négative (DN) périphériques, c'est-à-dire CD3⁺/CD4⁻/CD8⁻/B220⁺ [62]. Un dysfonctionnement de CD95 peut entraîner des syndromes lymphoprolifératifs, évoluant en lymphomes, ou alors contribuer à l'installation de maladies auto-immunes [63].

Les lymphocytes B auto-réactifs, ou ayant des Ig trop peu affines après l'hypermutation somatique, sont également éliminés par un signal CD95 dépendant [64, 65]. En effet, ces lymphocytes B ne recevront pas les signaux de survie provenant des T CD4⁺ et des cellules dendritiques via leur CD40L. Elles vont ainsi perdre l'expression de c-FLIP, et mourir via un signal CD95 dépendant [66].

2.2.3.2. Autres Rôles

En plus de son rôle apoptotique, le récepteur CD95 est capable de transmettre des signaux non-apoptotiques, pouvant conduire à la survie et la prolifération des lymphocytes T [67, 68] mais également à l'inhibition de l'activation des lymphocytes T [69], à la maturation des cellules dendritiques [70] et des neurones [71, 72], ou encore à la tumorigénèse [73-75].

- *Rôle dans le foie*

L'expression constitutive de CD95 est observée dans presque tous les types cellulaires du foie, incluant les hépatocytes [76, 77], ou encore les cellules de Kupffer [78]. Comme toutes ces cellules sont susceptibles de mourir par apoptose via CD95, il est impératif que le signal CD95/CD95L soit régulé de façon précise. CD95 n'est que très peu présent à la surface des cellules du foie, et la majeure partie du pool de CD95 est localisé dans le complexe Golgien, ou dans le réseau trans-Golgien [79]. Après stimulation, les vésicules golgiennes contenant CD95 vont fusionner avec la membrane plasmique, augmentant par conséquent la densité de CD95 à la membrane [79]. L'expression de CD95L est également régulée, et le système CD95/CD95L semble jouer un rôle capital dans l'homéostasie cellulaire du foie [80]. En effet, il a été montré que CD95 joue aussi un rôle dans la régénération hépatique [81]. De plus, une dérégulation du système CD95/CD95L a été observée dans les hépatites alcooliques, ou encore la maladie de Wilson liée à une accumulation de cuivre [76]. De plus, l'injection d'un anticorps agoniste du CD95 chez la souris s'accompagne de l'induction d'une hépatite fulminante (apoptose massive des hépatocytes) [82, 83]. Cette hépatotoxicité associée à l'injection d'un agoniste du CD95 est une limite considérable quant à des stratégies antitumorales chez l'homme.

2.3. Le ligand du CD95 : le CD95L

CD95L (FasL ou Apo1L) appartient à la famille du TNF (*tumor necrosis factor*)

2.3.1. Structure

2.3.1.1. Le gène

Le gène de CD95L est localisé chez la souris comme chez l'Homme sur le bras long du chromosome 1 (1q23 chez l'Homme). Ce gène s'étend sur 8 kb et est découpé en 4 exons [84].

2.3.1.2. La protéine

Le CD95L est une protéine transmembranaire de type II. Cette protéine de 40kDa contient 281 acides aminés dont 80 intracytoplasmiques [85]. Le CD95L humain possède 76% d'identité avec le CD95L murin. Ces ligands ne sont pas restreints d'espèce et déclenchent un signal d'apoptose vis-à-vis du CD95 humain comme du CD95 murin [86]. La région carboxy-terminale de CD95L est impliquée dans la reconnaissance de CD95 et plus précisément, pour le ligand humain, les acides aminés en position 275 (phénylalanine), 206 (proline) et 218 (tyrosine) [87]. Il existe également trois sites de N-glycosylation (asparagines en position 184, 250 et 260), dans la partie extracellulaire, qui semblent jouer un rôle dans l'expression de CD95L à la membrane [88]. Dans sa partie intracellulaire, le CD95L possède une région riche en proline capable d'interagir avec des protéines ayant des domaines SH3 (Src homolgy 3) ou WW [89]. CD95L est retrouvé principalement sous deux formes *in vivo* : une forme membranaire [85] et une forme soluble (sCD95L) [90]. Cette dernière a une masse de 26 kDa et provient du clivage de la protéine membranaire par des métalloprotéinases comme la Stromelysin-1 (encore dénommée MMP-3 pour *matrix metalloproteinase-3*) [91] ou la métalloprotéinase matricielle 7 (MMP-7) [92]. Plus récemment, la métalloprotéinase MMP-9, a été impliquée dans le contrôle de l'expression de CD95L à la membrane de neurones [93]. De plus, la protéine ADAM10, qui appartient à la famille des ADAM (*a-disintegrin and metalloprotease*), a été décrite comme étant la protéase principale responsable de la formation de sCD95L [94]. Suite au clivage par ADAM10, la partie intracellulaire de CD95L restée ancrée à la membrane, va être clivée par la protéase SPPL2a (*signal peptide peptidase-like protease 2a*) qui est une protéase intramembranaire [95]. Cette partie intracellulaire est ainsi libérée dans le cytoplasme, et via un adressage au noyau, joue un rôle essentiel dans la régulation de certains gènes.

Le CD95L soluble est homotrimérique [96]. Il a été montré que seul le CD95L membranaire entraîne une activation forte de CD95 [97, 98]. Le CD95L soluble quant à lui, peut soit inhiber le signal apoptotique déclenché par le ligand membranaire [97, 99, 100], soit au contraire, lors de sa fixation par la fibronectine de la matrice extracellulaire, induire la mort des cellules par apoptose [101]. De plus, le CD95L soluble est un chimio-attracteur, induisant la migration de neutrophiles et de cellules phagocytaires au site inflammatoire [102, 103]. Outre ces formes membranaire et soluble, CD95L peut aussi exister sous une forme membranaire possédant une activité cytotoxique, à la surface de petites vésicules, les exosomes [104].

2.3.2. *Expression*

Contrairement à CD95, la distribution de CD95L est très limitée. On le retrouve principalement sur les lymphocytes T et les cellules NK (*natural killer*) activés. Il est également présent dans certaines zones dites « immuno-privilégiées » comme l'œil [105], le placenta, le cerveau ou les testicules où il constitue un des mécanismes de la tolérance au soi de ces organes [85] (voir paragraphe 2.3.3.3). Les macrophages infectés par le VIH sur-expriment CD95L, ce qui pourrait être la cause de l'élimination des lymphocytes T CD4⁺ dans la maladie [106]. De plus, des protéines virales telles que Tat ou gp120 sensibilisent ces lymphocytes T au signal CD95/CD95L [107]. Les cellules dendritiques sur-expriment elles aussi CD95L lors de leur infection par le CMV (*cytomégalo*virus) humain. Ainsi ces cellules infectées tueraient les lymphocytes T activés ce qui inhiberait la réponse immunitaire antivirale [108]. La costimulation de CD95, lors de l'activation du lymphocyte T, peut également induire une inhibition de l'activation de ces lymphocytes, bloquant ainsi leur prolifération [69]. Ce mécanisme serait une autre possibilité donnée aux cellules exprimant le CD95L pour échapper au système immunitaire. Le CD95L peut être également exprimé sur certaines cellules tumorales, ce qui participe au mécanisme d'évasion immune (voir paragraphe 2.3.3.3).

2.3.3. *Fonctions physiologiques*

2.3.3.1. *Cytotoxicité*

Les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, certains lymphocytes T CD4⁺ et les NK activés expriment CD95L et peuvent ainsi éliminer leur cellule cible via le signal CD95/CD95L agissant en parallèle du système perforine/granzyme B [109, 110] (figure 5).

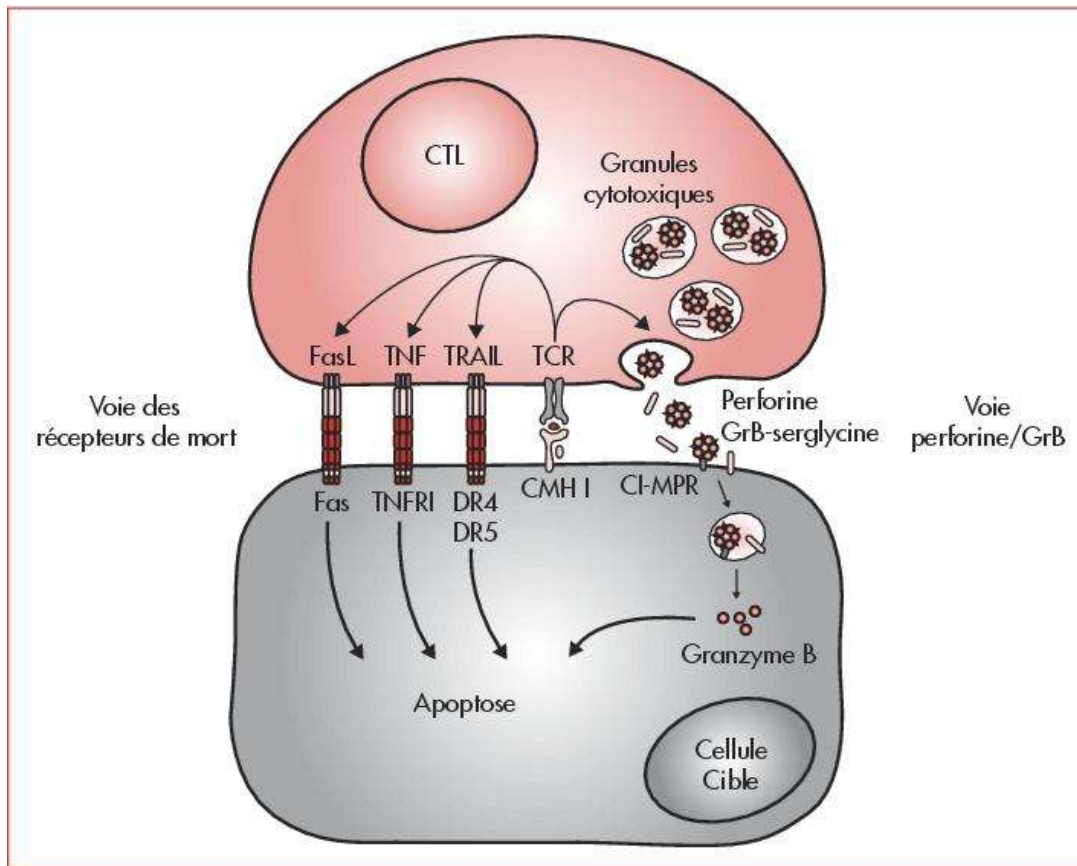


Figure 5: Voie de cytotoxicité des lymphocytes T cytotoxique (CTL)

D'après Dorothee et al, Hématologie, 2004.

2.3.3.2. L'AICD

Suite à leur activation, les lymphocytes T vont proliférer et migrer en périphérie jusqu'au site de l'infection ou de la tumeur. Durant cette première phase d'activation, ces lymphocytes sont protégés de la mort via le CD95 [57]. Arrivés sur le site infecté ou transformé, la restimulation des lymphocytes par l'antigène entraîne l'élimination des cellules cibles puis elle contribue à la mort des lymphocytes T activés par un signal dépendant de CD95 [111]. L'expression concomitante de CD95 et de son ligand sur les lymphocytes T activés permet de déclencher la mort de manière autocrine ou paracrine. Ce phénomène de régulation négative (contraction) de la réponse immunitaire est appelé AICD [61]. Plus récemment, des études ont démontré que le système CD95/CD95L participerait à l'AICD de lymphocytes T auto-immuns, activés par des auto-antigènes de faible affinité [112]. L'élimination des

lymphocytes T activés par des antigènes étrangers ou transformés et possédant une forte affinité pour le TCR, dépendrait de la présence de molécules de la famille Bcl-2 possédant un domaine unique BH3 comme Bim [113] (figure 6).

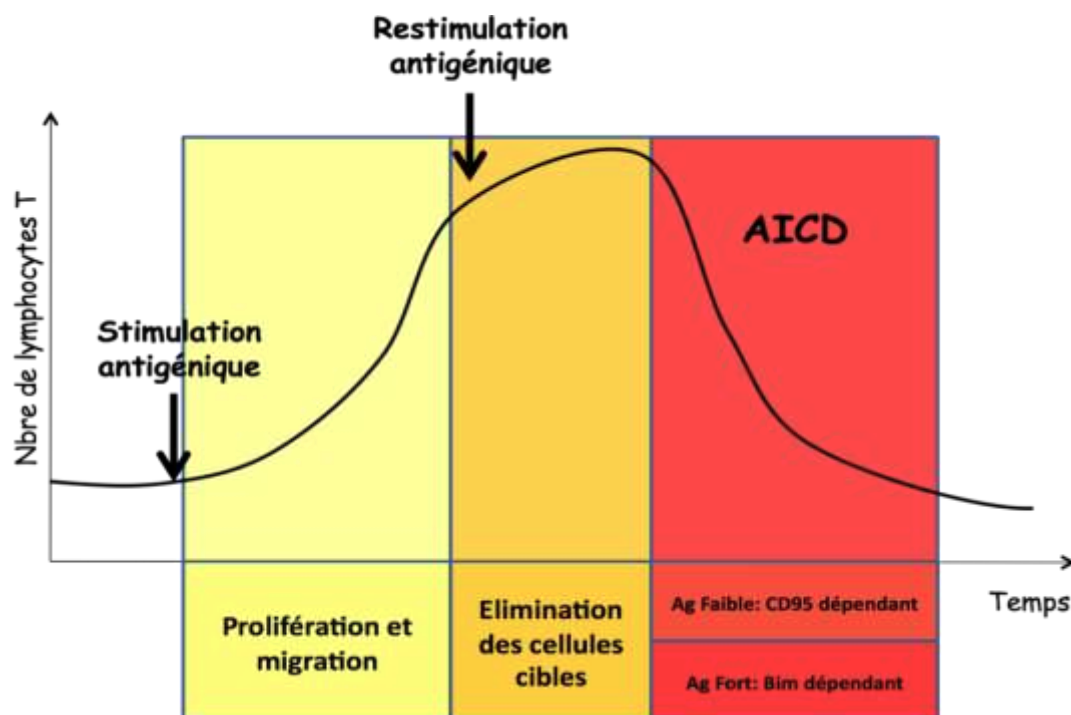


Figure 6: Schématisation de la cinétique d'activation des lymphocytes en réponse à l'antigène.

Ag pour Antigène ; AICD pour *T cell-autonomous activation-induced cell death*.

D'après Thome et Tschopp, Nat Rev Immunol, 2001 et Bouillet et O'Reilly, Nat rev Immunol, 2009

2.3.3.3. Notion de « privilège immun »

Dans certains organes et tissus, la réponse immunitaire physiologique est très régulée, car toute réaction inflammatoire dans ces régions pourrait avoir des conséquences désastreuses. Un des mécanismes de protection de ces tissus immunoprivilégiés est l'expression constitutive de CD95L. Cette protection a été démontrée notamment dans des expériences de greffe de cornée chez la souris [114] : les greffes sont très bien tolérées, même en l'absence de compatibilité ; en revanche, les cornées de souris déficientes pour le CD95L (souris *gld*)

sont rejetées [115]. Il en est de même chez l'Homme, la greffe de cornée n'étant pas précédée de recherche de compatibilité tissulaire.

2.3.3.4. *L'évasion immune*

L'expression de CD95L a été observée dans de nombreuses tumeurs, notamment des carcinomes colo-rectaux [116], hépato-cellulaires [117], ou des mélanomes [118]. Des études *in vitro* ont démontré que ces cellules tumorales exprimant le CD95L étaient capables d'induire l'apoptose de lymphocytes échappant ainsi à la réponse immunitaire [117, 119]. Cependant, ce mécanisme est très controversé [120].

2.3.3.5. *Implication dans l'inflammation*

Un effet pro-inflammatoire a été attribué à CD95L [121]. Ce rôle est moins connu et semble relié à un pouvoir chimio-attracteur de CD95L soluble sur des cellules impliquées dans la réponse inflammatoire comme les polynucléaires neutrophiles [102, 122]. Ce processus physiologique a été mis en évidence à travers la greffe d'îlots de Langerhans du pancréas exprimant de manière ectopique CD95L, qui se retrouve être rejetée plus rapidement que les îlots témoins n'exprimant pas CD95L [123, 124]. Des cellules tumorales transfectées avec le gène du CD95L puis injectées à un animal receveur sont, elles aussi, éliminées beaucoup plus rapidement que les cellules transfectées avec un vecteur contrôle. Dans ces deux cas, des études histologiques ont mis en évidence un foyer inflammatoire contenant des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes T. Ces expériences semblent démontrer que le CD95L n'est pas le seul facteur responsable du « privilège immunitaire ».

2.3.4. Molécules mimant les effets cytotoxiques du CD95L

2.3.4.1. Anticorps agonistes

Ces anticorps déclenchent un signal de mort cellulaire en mimant l'action du ligand. Les IgM (clones 7C11 [125] et CH11 [126]) peuvent, en théorie, réunir à la surface cellulaire jusqu'à 10 trimères de récepteurs et les IgG3 [clone Apo1.3 [127]] sont capables de s'auto-agréger par leur domaine Fc. Ils fonctionnent donc probablement sur un principe similaire, par agrégation du récepteur. On trouve également des anticorps d'isotype IgG1 (clones DX2 et Apo1.1) qui sont capables, utilisés seuls, de déclencher un signal de mort uniquement dans certaines cellules [128]. Lorsque ces anticorps sont employés avec un agent polymérisant (la protéine A ou un anticorps anti-IgG), leur efficacité est augmentée.

2.3.4.2. CD95L recombinant

Dans la littérature, plusieurs formes recombinantes de CD95L solubles fonctionnels ont été décrites :

- L'une d'elles comprend le domaine extracellulaire de CD95L auquel est fusionné, dans la partie amino-terminale, une « étiquette » peptidique contre laquelle on dispose d'un anticorps monoclonal. L'incubation avec l'anticorps permet ainsi d'agréger les trimères de CD95L ce qui lui confère sa cytotoxicité.
- D'autres formes consistent en la fusion du domaine extracellulaire de CD95L avec un domaine homotypique, tels une séquence Leucine zipper [129] ou le domaine collagène de la protéine ACRP30 (ou adiponectine) [130, 131].
- Plusieurs molécules chimériques de CD95L solubles ont été générées au laboratoire, ils contiennent le domaine extracellulaire du CD95L membranaire humain fusionné avec différents domaines de la gp190, récepteur de basse affinité au LIF : les domaines « Ig-like », « D1 » et « D2 » [132]. Les molécules ainsi générées sont cytotoxiques en l'absence d'agent polymérisant (*Daburon et al., article soumis*).

2.3.5. Anomalies et pathologies du système CD95/CD95L

2.3.5.1. Chez la souris

- Des mutations dans le récepteur CD95 ont tout d'abord été caractérisées chez la souris. Les souris *lpr* (pour *lymphoprolifération*) présentent une lymphoprolifération abusive qui aboutit à des adénopathies et une splénomégalie. Ces souris produisent des quantités excessives d'Immunoglobulines G (IgG) et M (IgM) et développent des maladies auto-immunes. Elles meurent vers l'âge de cinq mois de néphrites ou d'arthrites [133]. Une fraction importante des lymphocytes T matures montre un phénotype « double-négatif » (DN), alors que cette population est anecdotique dans le sang périphérique de l'animal normal. Chez les souris *lpr*, ces lymphocytes expriment un TCR de type $\alpha\beta$ alors que les lymphocytes DN circulants ont, en majorité, un TCR $\gamma\delta$. La souche murine MRL *lpr* renferme un élément transposable long de 5,3 kb inséré dans l'intron 2 du gène CD95 [134]. Ce transposon entraîne un arrêt prématuré de la transcription du gène [135]. La protéine CD95 sauvage est tout de même exprimée mais en quantité très faible [136]. L'effet de cette mutation est beaucoup moins prononcé dans la souche C57BL/6. Moroy et ses collaborateurs ont démontré que l'expression de la kinase Pim-1 dans les souris C57BL/6 *lpr/lpr* exacerbe la lymphoprolifération, suggérant l'implication de plusieurs mutations coopératives dans le phénotype de prolifération lié aux manifestations auto-immunes [137].
- Le phénotype *lpr* peut être induit par des mutations différentes dans le gène CD95 [133]: Dans la souche murine CBA/KlJms *lpr*, une mutation ponctuelle dans la séquence du DD entraîne le remplacement de l'isoleucine en position 246 par une asparagine. Cette mutation est dénommée *lpr^{cg}* (*lpr complementing gld*) [138]. Cette mutation abolit la transduction du signal apoptotique CD95 car son domaine de mort est incapable de recruter efficacement la protéine adaptatrice FADD [63].

Comme pour CD95, les anomalies liées à des mutations de CD95L ont tout d'abord été caractérisées chez la souris. Les souris *gld* (*generalized lympho-proliferative disease*) possèdent le même phénotype que les souris *lpr*. La mutation *gld* est une mutation ponctuelle dans la région carboxy-terminale de CD95L, remplaçant une phénylalanine en position 273

par une leucine. Cette mutation diminue de façon drastique la fixation du ligand sur CD95 [86]. Cette mutation a été transférée au CD95L humain avec le remplacement de la phénylalanine en position 275 par une leucine. Comme chez la souris, ce mutant ne peut plus alors se lier au récepteur CD95 sauvage [87].

2.3.5.2. Chez l'Homme

- *Syndrome lymphoprolifératif auto-immun*

Chez l'Homme, on retrouve un phénotype analogue aux souris *lpr*, nommé ALPS pour *autoimmune lymphoproliferative syndrome* [139]. Les patients souffrant d'ALPS accumulent lymphoproliférations, lymphadénopathies, hépatosplénomégalias, et anémies hémolytiques auto-immunes. Comme pour les souris *lpr* ou *gld*, on retrouve une quantité importante de lymphocytes T $\alpha\beta$ DN chez ces patients. De plus, une hypergammaglobulinémie est observée, associée à la présence d'auto-anticorps (anti-érythrocytes et anti-nucléaires, notamment). Décrite il y a près de quarante ans par Canale et Smith [140], elle n'a été associée aux phénotypes des souris *lpr* et *gld* que plus récemment, lorsque Fisher et ses collaborateurs ont mis en évidence chez 5 patients indépendants l'existence de mutations du récepteur CD95 [141]. Il existe actuellement, cinq sous-types d'ALPS identifiés avec des symptômes cliniques très proches mais des mutations sur des gènes différents. L'ALPS de type Ia regroupe les mutations hétérozygotes sur le gène CD95. Il a récemment été mis en évidence des mutations somatiques dites mosaïques du gène CD95, n'affectant que certaines cellules, chez des patients atteints d'ALPS [142]. Ce syndrome classé à l'origine en type III (cause inconnue), a été renommé ALPS de type Im. Plus de 70 mutations ont été répertoriées à ce jour (ALPS database <http://research.nhgri.nih.gov/ALPS/>), affectant en majorité l'exon 9, codant pour le domaine de mort du récepteur CD95. Des études *in vitro* ont montré que la co-expression de récepteurs mutés non-fonctionnels avec des formes sauvages prévenait le recrutement de FADD et donc inhibait le signal de mort par un effet dominant-négatif [143]. Cet effet s'explique par le fait que le signal de mort dépendant de CD95 requiert un complexe homotrimérique [32] dont la stoechiométrie est perturbée par l'incorporation d'un monomère déficient. Un très faible nombre de patients sont porteurs de mutations homozygotes (type 0) et présentent des symptômes exacerbés [144-146]. La complication majeure de cette pathologie est un risque accru de développer des lymphomes non-Hodgkiniens et

Hodgkiniens (14 et 51 fois plus que la population générale, respectivement) [147]. Dans le cadre de ces études, il a été rapporté que lorsqu'un des deux parents des enfants atteints d'ALPS de type Ia est également porteur de mutations dans le gène CD95, ces individus ne possèdent en général aucun symptôme bien que leurs lymphocytes présentent une résistance à l'apoptose CD95 dans les tests *in vitro* [141, 148, 149]. Il est donc clair que d'autres facteurs, génétiques et/ou environnementaux influencent le phénotype clinique. Par exemple, Chiocchetti et ses collaborateurs ont établi un lien entre des polymorphismes dans le gène de l'ostéopontine et la possibilité de développer un syndrome lymphoprolifératif [150].

Chez l'Homme, une forme du syndrome ALPS est également associée à une mutation du ligand. Cette mutation a été caractérisée chez un patient dont le premier diagnostic avait été un lupus érythémateux disséminé [151]. Ce malade possédait une délétion de 84 nucléotides dans l'exon 4 du gène de CD95L sans décalage du cadre de lecture. La protéine, tronquée de 28 acides aminés dans la région carboxy-terminale, n'était plus fonctionnelle. Cette forme d'ALPS a été dénommée ALPS de type Ib.

- *Cancers*

Comme nous l'avons évoqué plus haut, les patients atteints d'ALPS de type Ia ont un risque accru de développer des lymphomes [147, 152]. De plus, des mutations germinales du gène APT1 ont été retrouvées chez des patients atteints de pathologies malignes d'origine hématopoïétique, notamment dans des lymphomes B [153] et des lymphoproliférations de cellules T [154, 155]. Des mutations somatiques du gène CD95 ont été mises en évidence dans de nombreux types de cancers solides, tels que des cancers de la prostate [156], de la vessie [157], du poumon [158], des cancers gastriques [159] et des mélanomes [160]. La majorité des mutations concernent l'exon 9, codant pour le DD du récepteur et sont hétérozygotes. Considérant la survenue de telles mutations, il a été proposé que CD95 se comporte comme gène suppresseur de tumeur [161].

- *Diabète insulino-dépendant (diabète de type I)*

Chez les patients diabétiques, les lymphocytes T détruisent les cellules β du pancréas sans entraîner de dommage sur les cellules α et δ . Les cellules β sont plus sensibles que leurs voisines à l'effet cytotoxique des molécules de l'inflammation telles que l'IL1 β et le NO (monoxyde d'azote). Les macrophages activés produisent ces molécules et activent des lymphocytes T CD4+. Le couple cytokines de l'inflammation et lymphocytes T CD4+ activés est explosif. En effet, sous l'action de l'IL1 β et de l'oxyde nitrique (NO), les cellules β vont exprimer CD95 [162] et seront détruites par les lymphocytes T activés, exprimant CD95L, qui ont infiltré le site de l'inflammation. Ce mécanisme semble être responsable, tout au moins en partie, de certains diabètes de type I [163].

- *Thyroïdite de Hashimoto*

Un mécanisme similaire semble être responsable de la destruction des thyrocytes dans la thyroïdite de Hashimoto. La thyroïdite de Hashimoto est une thyroïdite chronique auto-immune et peut parfois évoluer vers une encéphalite. Les thyrocytes expriment à leur surface du CD95L mais également de faibles quantités de CD95. Lors d'une réaction inflammatoire, les thyrocytes sur-expriment CD95 sous l'action de l'IL1 β , ce qui déclencherait un processus de suicide [164].

- *Autres pathologies*

De nombreuses études ont mis en évidence des corrélations entre des mutations du gène CD95 ou de son promoteur et certaines pathologies. Citons le cas du Lupus Erythémateux Disséminé pour lequel Kanemitsu et ses collaborateurs ont suggéré un rôle du polymorphisme A/G en position -670 dans la pathogenèse de la maladie [165-167].

3. La Transduction du signal CD95/CD95L

3.1. Les étapes membranaires

Bien que beaucoup étudiées, les étapes précoces du signal CD95 restent mal définies. Trois étapes semblent fondamentales pour l'initiation du signal CD95 lors de la fixation de son ligand, le CD95L : i) la formation de micro-agrégats de CD95, ii) la relocalisation de CD95 dans des microdomaines membranaires (voir paragraphe 4.4) [168, 169] et enfin iii) la formation de larges regroupements de CD95 (« CD95-CAP ou clusters ») permettant la formation du DISC pour *death inducing signaling complex*. Il a de plus été décrit des structures nommées SPOTS (*signaling protein oligomerization transduction structures*) contenant un grand nombre d'oligomères de CD95, visibles en microscopie après activation du récepteur et dont la formation dépend de FADD mais est indépendante de la caspase-8 [170].

3.1.1. La formation du DISC

Suite à la fixation du CD95L, le rapprochement des trimères de CD95 va induire un changement conformationnel, permettant l'ouverture sous forme stable du DD de CD95 (figure 4). Cette ouverture va permettre le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (*Fas associated death domain*), via une liaison homotypique de leur DD. La protéine FADD à son tour fixe et agrège les caspases initiateuses -8 et -10, via une liaison homotypique entre leurs domaines DED (*death effector domain*) respectifs (figure 7). Ces caspases ont la particularité de s'auto-cliver lorsqu'elles sont concentrées dans un espace restreint, permettant ainsi leur libération sous forme active dans le cytosol [171, 172]. Le complexe CD95/FADD/Caspase -8 -10 est appelé DISC [39] et se forme dans les minutes suivant la fixation du CD95L. Il faut également souligner la formation d'un deuxième complexe suite à la formation du DISC, le complexe II. Ce complexe II est localisé dans le cytosol, et contient la protéine FADD, la caspase-8 ainsi que la protéine c-FLIP mais pas le CD95. La formation de ce complexe permet l'activation de la caspase-8, et l'amplification du signal apoptotique [173] (figure 7). Une fois les caspases initiateuses activées, elles vont déclencher une cascade d'activation de caspases et la mort de la cellule. Vis-à-vis de la formation de ce DISC, il a été décrit deux

types cellulaires : les cellules dites de type I, où la formation du DISC est efficace, et les cellules de type II où la formation de ce DISC est inefficace (voir paragraphe 3.3).

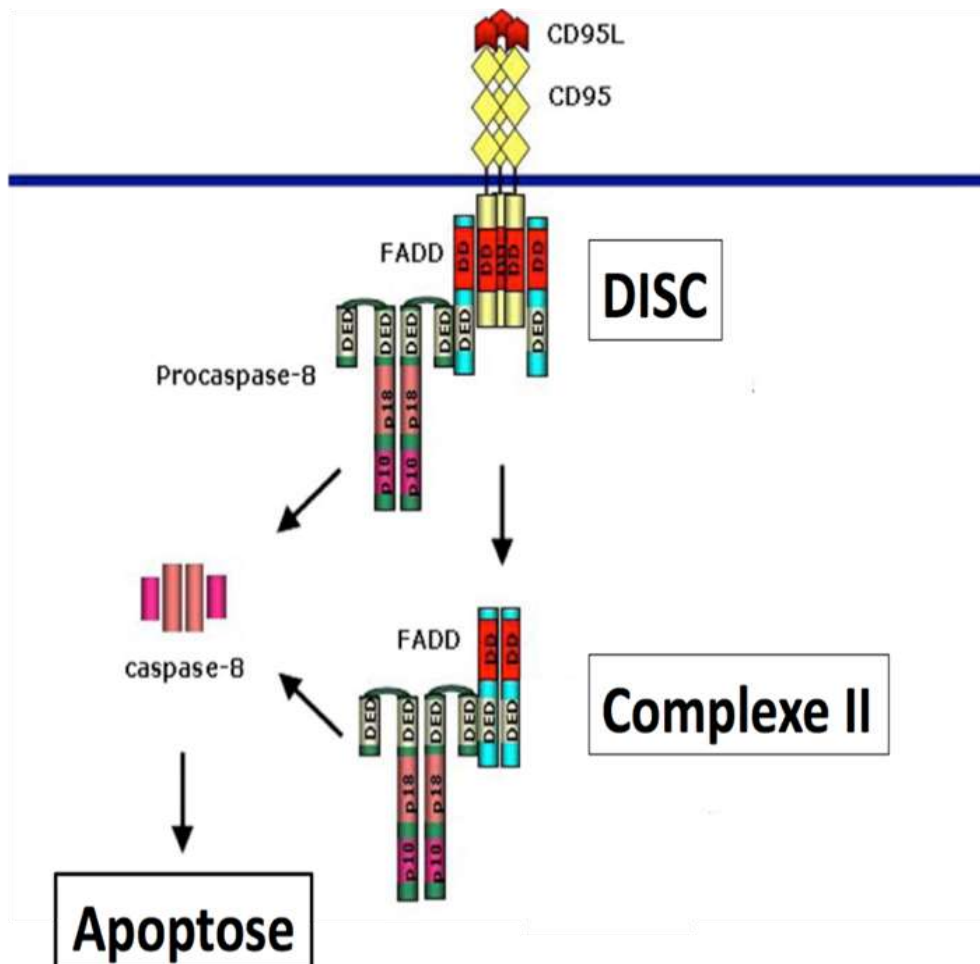


Figure 7: Formation du DISC et du complexe II

DD pour death domain, DED pour death effector domain. D'après Lavrik et al, J Biol Chem, 2008.

L'étape cruciale dans la formation de ce DISC, est la liaison CD95/FADD. Cette liaison, comme nous l'avons précédemment dit, n'est possible que si la protéine CD95 est sous forme ouverte et stable, et donc sous la dépendance de la proximité des molécules de CD95. Plusieurs mécanismes ont été décrits, pour rendre compte de la formation du DISC :

- *La production de céramides*

Les céramides, des sphingolipides biologiquement actifs, sont produits de façon endogène soit par synthèse *de novo* à l'aide de l'enzyme céramide synthétase, soit par hydrolyse de la sphingomyéline membranaire par les sphingomyélinases. Il a été montré que la stimulation de CD95 entraîne l'activation de la sphingomyélinase acide (aSMase) à travers un processus dépendant de l'activité catalytique de la caspase-8 [174]. La production de céramide augmente la fluidité membranaire, permettant la formation de « clusters » de CD95 qui sont localisés dans les microdomaines membranaires et qui induisent la formation du DISC [175, 176].

- *L'endocytose*

Dans les cellules de type I, il a été montré que suite à la stimulation de CD95, le récepteur est endocyté, et c'est cette internalisation, dépendante des microdomaines, qui permettrait la formation du DISC [177]. La présence de CD95 dans l'endosome précoce et/ou tardif permet son rapprochement des protéines FADD et caspase-8, qui sont elles, diffuses dans le cytosol. Cependant une étude récente a montré que l'internalisation n'est pas un phénomène général et dépend du ligand utilisé et du type cellulaire [168].

- *Palmitoylation*

La protéine CD95 est palmitoylée sur la Cystéine 199, ce qui semble être important pour la transmission du signal CD95 [178, 179]. En effet, la palmitoylation de CD95 est nécessaire à la formation du DISC, car elle est responsable de l'agrégation du récepteur, de son internalisation, et donc de sa capacité à induire l'apoptose. La palmitoylation est de plus impliquée dans la localisation de CD95 dans les microdomaines [178].

- *Les microdomaines membranaires*

Comme nous l'avons vu précédemment, les microdomaines membranaires sont impliqués dans le signal CD95. En effet, la localisation de CD95 dans ces microdomaines permet d'amplifier la formation du DISC [180, 181]. Nous discuterons plus en détails du rôle des microdomaines dans le signal CD95, dans le paragraphe 4.3.4.

3.1.2. *La cascade d'activation des caspases*

3.1.2.1. *Classification*

Les caspases sont classées en fonction de leur rôle cellulaire. Certaines sont essentielles pour la maturation des cytokines pro-inflammatoires, comme la caspase 1 et les caspases 4 et 5 [182]. Les caspases à activité pro-apoptotiques sont, quant à elles, réparties en deux groupes. Les caspases initiatrices sont les caspases 2, 8, 9 et 10 car elles participent au déclenchement du signal de mort. Les caspases effectrices sont les caspases 3, 6 et 7 et elles sont responsables du clivage de substrats dont dépend le démantèlement de la cellule [183]. La caspase 12 est impliquée dans l'apoptose dépendante du réticulum endoplasmique, c'est un pseudo-gène chez l'Homme [184]. La caspase 14 est impliquée dans la différenciation des kératinocytes [185, 186].

3.1.2.2. *Structure*

Les caspases sont composées d'un prodomaine dans la région amino-terminale. Ce domaine est court pour les caspases effectrices, comme la caspase 3 avec un prodomaine de 9 ou 28 acides aminés en fonction de l'acide aspartique après lequel est clivé ce fragment aminoterminal [187] et long pour les initiatrices (plus de 200 acides aminés pour les caspases 8 et 10). Les prodomaines des caspases initiatrices renferment des séquences participant à leur agrégation par liaisons homotypiques avec les protéines adaptatrices telles que FADD ou Apaf1 (*apoptotic protease activating factor*). Le prodomaine est suivi de la grande sous-unité (~ 20 kDa) et dans la partie carboxy-terminale de la petite sous-unité (~ 10 kDa). A la jonction entre ces domaines se trouvent des séquences de quatre acides aminés qui permettent

de déterminer quel type de caspase peut cliver la pro-enzyme [188]. Après protéolyse de la petite puis de la grande sous- unité, ces deux sous-unités s'associent et forment un hétérodimère. Cet hétérodimère possède un site enzymatique actif. Enfin, deux hétérodimères s'associent pour former un tétramère avec deux sites catalytiques, c'est la structure de la caspase activée (figure 8) [189, 190].

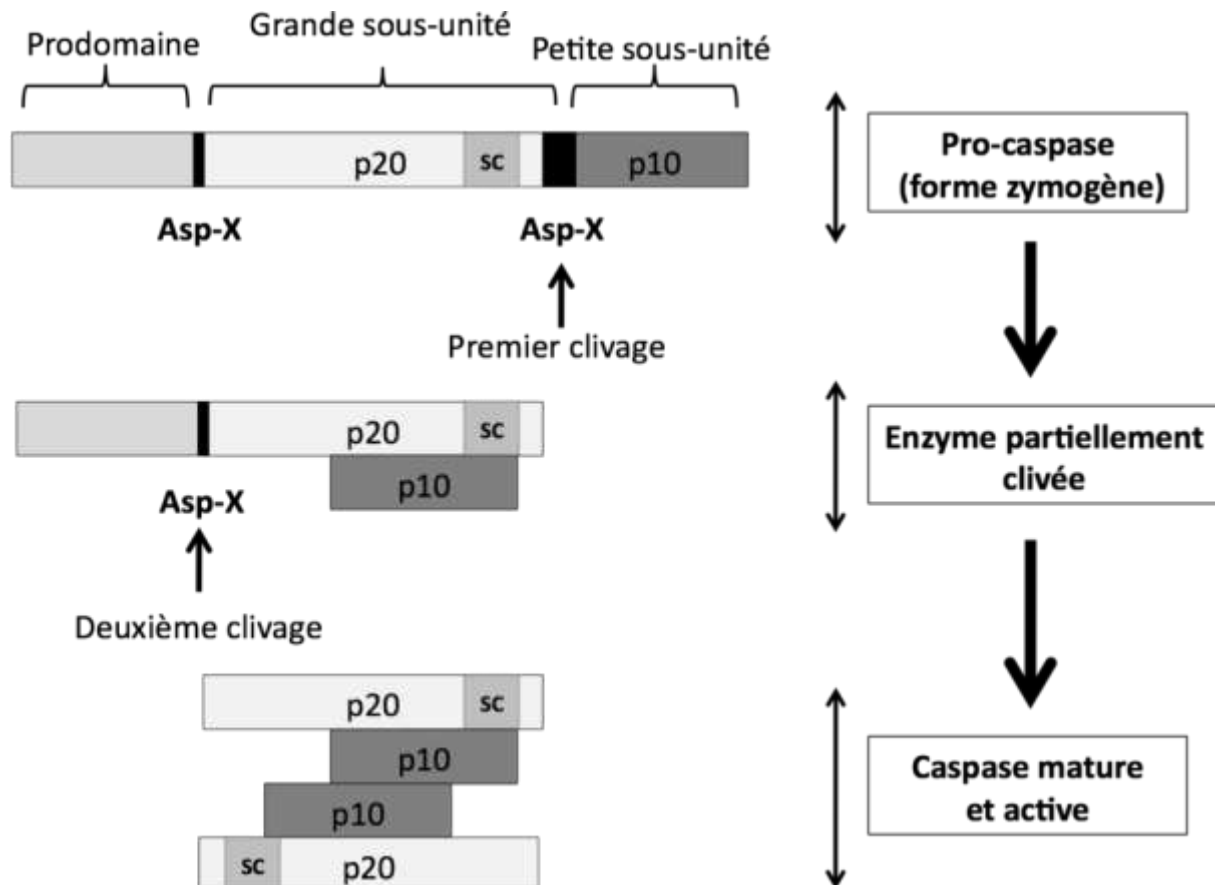


Figure 8: Mécanisme d'activation des caspases

SC : site catalytique. D'après Chowdhury et al, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2008.

3.1.2.3. Les caspases initiateuses

- Caspase 8

La caspase 8 a été identifiée comme un membre de la famille de l'enzyme de conversion de l'IL1 β (ICE ou caspase 1), ce qui a conduit à sa dénomination, FLICE pour FADD-like ICE [191]. La caspase 8 possède un long prodomaine constitué de deux domaines effecteurs de mort (DED), ce qui permet la fixation à FADD lors de la formation du DISC. La caspase 8 est présente sous différentes isoformes : 8 ont été décrites au niveau de l'ARNm mais au stade de la protéine, l'expression majoritaire est restreinte aux isoformes nommées a et b [192]. Depuis, il a été mis en évidence l'existence d'une isoforme inhibitrice, nommée caspase 8L [193], dont la partie carboxy-terminale est tronquée.

Plus récemment, Il a été décrit un clivage alternatif de la caspase-8 lors de la formation du DISC [194]. En effet, le premier clivage peut intervenir non pas entre la petite sous-unité et la grande, mais entre le pro-domaine et la grande sous-unité, pour donner un produit de clivage p30. Cette protéine p30 peut ensuite être clivée en p20/p10, mais peut également former des dimères actifs. De plus cette forme p30 est retrouvée au niveau du complexe II [194].

La caspase 8 exerce un rôle important au cours du développement embryonnaire car les souris dont le gène de la caspase-8 a été inactivé meurent *in utero* en présentant des défauts cardiaques et une hématopoïèse perturbée [195]. Les cellules issues de ces souris sont résistantes à l'apoptose dépendante des récepteurs de mort. La caspase-8 joue également un rôle dans la prolifération des lymphocytes via notamment l'activation du facteur NF- κ B pour les lymphocytes T [196, 197]. La participation de la caspase-8 dans le signal prolifératif ou apoptotique dépendrait de sa distribution spatiale [198].

Deux patients présentant un syndrome de type ALPS ont été rapportés comme possédant une mutation homozygote de la caspase 8 avec le remplacement de l'arginine en position 248 par un tryptophane. Cette mutation conduit à la traduction d'une protéine dépourvue d'activité enzymatique [199]. Cette forme d'ALPS est dénommée type IIb.

- *Caspase 10*

La caspase 10 a été identifiée par homologie avec la caspase 8 [200, 201]. Son gène est situé à proximité de celui de la caspase 8 sur le chromosome 2 et est absent chez la souris, ce qui implique une duplication génique récente. La protéine est présente sous trois isoformes (a, c et d). Comme la procaspase 8, la procaspase 10 est recrutée au niveau du DISC, par liaison homotypique entre son DED et celui de FADD et elle est activée par auto-clivage. Certains auteurs suggèrent un rôle redondant entre les deux caspases, dans la mesure où la surexpression de la caspase 10 est capable de restaurer un signal de mort dans des cellules déficientes pour la caspase-8, après activation par CD95L ou par TRAIL [202-204]. Cette hypothèse est cependant controversée [205]. D'autre part, malgré leur homologie, et notamment la capacité de cliver les mêmes substrats comme par exemple la protéine Bid (*B cell lymphoma-2-interacting domain*) [204], les caspases 8 et 10 semblent posséder une spécificité de substrat puisque à l'opposé de la caspase-8, la caspase-10 est incapable de cliver la protéine RIP (*receptor interacting protein*) [203]. Wang et ses collaborateurs ont décrit deux patients atteints d'ALPS qui possédaient une mutation ponctuelle dans le gène de la caspase 10 (V367I et L242F) [206] ; la pathologie a été classée en ALPS de type IIa. L'une de ces mutations a été décrite plus tard comme un polymorphisme fréquemment rencontré dans la population danoise [207]. Plus récemment, Zhu et al ont mis en évidence une nouvelle mutation dans le gène de la caspase 10 (I406L). Cette forme mutée agit comme un dominant négatif sur l'apoptose [208].

- *Caspase 9*

Le prodomaine de la procaspase 9 contient un domaine CARD, qui fixe une séquence homologue dans Apaf1 [209, 210]. Cette liaison est sous la dépendance de cofacteurs comme le cytochrome c et l'adénosine triphosphate déoxyribonucléotide (dATP). Apaf1, le cytochrome c, le dATP et la procaspase 9 forment un complexe appelé apoptosome. A l'opposé de la caspase-8 ou de la caspase-10, l'agrégation de la caspase-9 n'est pas suivie du clivage de son prodomaine et elle reste associée à l'apoptosome où elle recrute et active la caspase-3 [211]. La caspase 9 est décrite dans ce chapitre bien qu'ayant un rôle prépondérant dans l'activation de la voie mitochondriale (voie intrinsèque), car la formation de l'apoptosome est requise pour la signalisation apoptotique déclenchée par CD95 dans les cellules dites de type II [212] (figure 10). Comme la caspase-8, la caspase 9 possède un rôle

essentiel au cours du développement puisque les souris KO meurent *in utero* en présentant des malformations cérébrales [213].

3.1.2.4. *Les caspases effectrices*

3.1.2.4.1. *Mode d'action*

Les caspases effectrices sont des substrats des caspases initiatrices [214]. Elles permettent l'amplification du signal de mort cellulaire et son déroulement jusqu'au démantèlement de la cellule. Ces caspases possèdent un pro-domaine court et sont pré-associées en homodimère. Le clivage par des caspases initiatrices permet un changement conformationnel conduisant au démasquage du site actif [215, 216]. De plus, les caspases -3 et -7 peuvent aussi être clivées et activées par une sérine protéase comme le granzyme B, libéré par les granules cytotoxiques des lymphocytes T et NK [200](figure 5).

3.1.2.4.2. *Substrats des caspases effectrices*

Les manifestations morphologiques de l'apoptose s'expliquent par la nature et la diversité des substrats clivés par les caspases effectrices.

- **Structure cellulaire**

Les caspases sont responsables de la dégradation de protéines impliquées dans l'assemblage du cytosquelette avec les membranes cellulaires, comme la gelsoline [217, 218] et la FAK (*focal adhesion kinase*) [219, 220]. Le clivage de ces protéines perturbe alors la structure cellulaire, les contacts avec les cellules voisines et la matrice extracellulaire. Ceci explique notamment pourquoi les cellules adhérentes se détachent de leur support au cours du processus apoptotique. La lamine, qui est un support structural de la membrane nucléaire et de la chromatine, est dégradée par les caspases -3 [218] et -6 [221], ce qui entraîne la condensation de la chromatine et du noyau cellulaire.

- Fragmentation de l'ADN

La CAD (*caspase-activated DNase* ou DFF40 pour *DNA fragmentation factor*) est une nucléase responsable des coupures inter-nucléosomiques de l'ADN. Elle forme un hétérodimère avec ICAD (*inhibitor of CAD* ou DFF45) qui au repos maintient CAD inactive dans le cytoplasme. Lors du signal apoptotique, ICAD va être clivé par la caspase-3 [222, 223], ce qui libère CAD qui se redistribue dans le noyau et fragmente l'ADN [224, 225].

Les souris déficientes en CAD, ou transgéniques exprimant un ICAD non clivable, subissent encore une fragmentation de l'ADN lors de stimuli apoptotiques. Cette fragmentation est dépendante du relargage par la mitochondrie de l'Endonucléase G et de AIF (*apoptosis initiating factor*) qui se relocalisent dans le noyau et clivent l'ADN [226].

- Maintien du pool d'ATP

La poly(ADP-ribose) polymérase-1 (PARP-1) est une enzyme nucléaire impliquée dans la stabilité et la réparation de l'ADN ainsi que dans la régulation transcriptionnelle. Elle est clivée et rendue inactive par la caspase-3. Ce clivage a longtemps été considéré comme un marqueur de l'apoptose. Aujourd'hui cependant, certaines données suggèrent que cette inactivation permettrait le maintien d'une quantité d'ATP dans la cellule afin de faciliter le processus apoptotique [227]. En effet, lorsque PARP-1 est suractivée, les réserves d'ATP sont diminuées et la cellule meurt par un processus nécrotique [228].

3.2. Voie intrinsèque : la mitochondrie

3.2.1. Signaux déclencheurs

La mitochondrie est impliquée dans la signalisation apoptotique induite par l'accumulation des lésions de l'ADN, la privation en facteurs de croissance, la chimiothérapie ou encore, lors de l'activation du récepteur CD95 dans les cellules dites de type II.

- Les lésions de l'ADN

Elles sont déclenchées soit directement par les radiations gamma ou les ultraviolets soit indirectement par l'intermédiaire de molécules telles que les inhibiteurs de topoisomérases. L'étoposide (ou VP16), par exemple, est un inhibiteur de topoisomérase de type II [229]. Il agit en empêchant l'activité de religation de l'enzyme, ce qui conduit à la création de cassures d'ADN doubles brins [230, 231]. A la suite de ces lésions de l'ADN, le gène suppresseur de tumeur p53 est sur-exprimé et la demi-vie de sa protéine est augmentée [232]. L'activation et la stabilisation du facteur de transcription p53 entraînent l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée de la cellule en apoptose par le déclenchement de la voie mitochondriale. En effet, il a été démontré que la protéine p53 activée augmente l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax [233] et diminue l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 [234]. p53 peut aussi orchestrer le signal apoptotique CD95/CD95L via l'induction de l'expression de CD95L et/ou de son récepteur [235, 236]. En effet, le promoteur du gène APT1 contient une séquence spécifique pour la fixation de p53 [237].

- La staurosporine

La staurosporine est un puissant inhibiteur des PKC (*protein kinase C*) [238] qui sont responsables de la phosphorylation de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bid ou Bad [239] (voir paragraphe suivant). Ces protéines phosphorylées ne peuvent plus être clivées dans le cas de Bid ou sont séquestrées dans le cytosol dans le cas de Bad [240] et ainsi ne peuvent plus transmettre leur message de mort. L'inhibition des PKC par la staurosporine pourrait donc empêcher ces phosphorylations et favoriser l'activation de ces molécules.

3.2.2. La famille Bcl-2

La régulation de l'apoptose par la mitochondrie est sous le contrôle d'une famille de protéines : la famille Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) (figure 6). Cette famille est divisée en deux groupes aux propriétés pro- ou anti-apoptotiques. Ces protéines interagissent en formant des homo- ou hétéro-dimères et le ratio moléculaire entre facteurs pro- et anti-apoptotiques semble participer à l'inhibition ou au déclenchement du message apoptotique par l'organite [241]. Certaines de ces molécules contiennent un domaine transmembranaire à l'extrémité carboxy-terminale permettant un ancrage à la membrane mitochondriale externe, notamment. Le groupe contenant les molécules anti-apoptotiques est représenté par Bcl-2 lui-même, et est caractérisé par la présence de quatre domaines BH (pour *Bcl-2 Homology*). Il comprend notamment les molécules Bcl-x_L et Mcl-1.

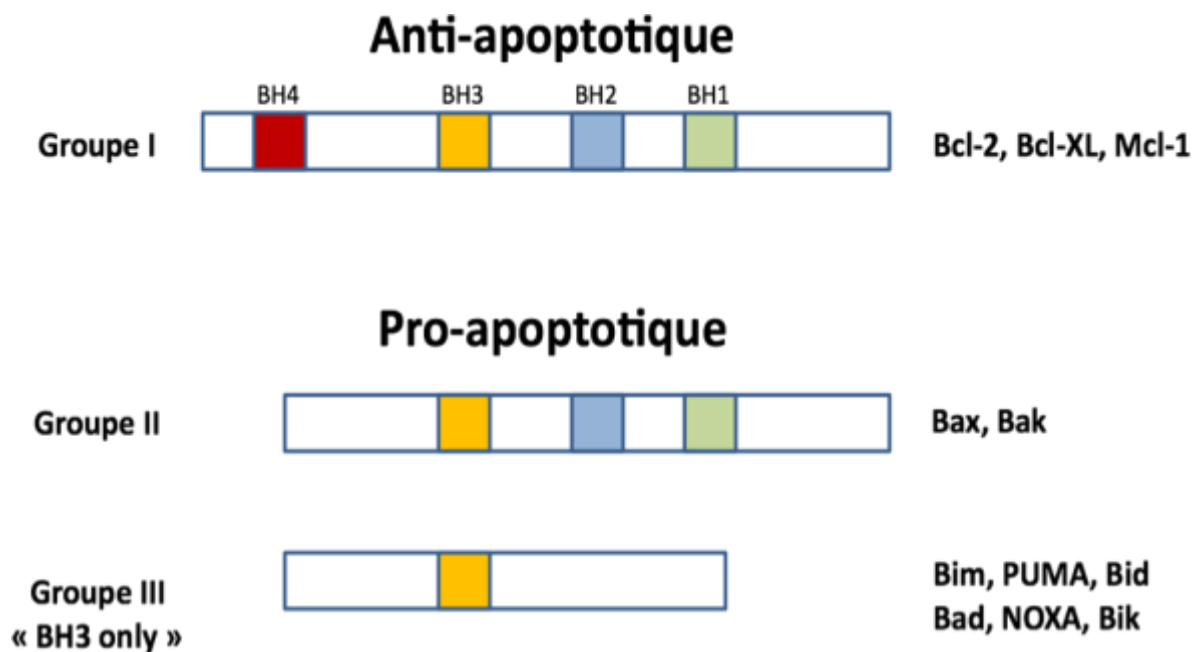


Figure 9: Classification des membres de la famille Bcl-2

La famille contenant les facteurs pro-apoptotiques est divisée en deux sous-groupes. Certains possèdent deux ou trois domaines BH comme les protéines Bax ou Bak, alors que d'autres n'en possèdent qu'un seul. Ce dernier groupe est surnommé protéines « BH3 only » et il est composé des protéines Bim (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*), PUMA (*p53-upregulated modulator of apoptosis*), Bid (*BH3-interacting-domain death agonist*), Bad (*Bcl-2-associated death promoter*), NOXA et Bik (*Bcl-2 interacting killer*). Il existe un grand nombre d'interactions entre ces molécules pro-apoptotiques, mais également avec les molécules anti-apoptotiques.

Deux modèles découlent de ces interactions : le premier modèle décrit une activation directe des molécules apoptotiques Bax et Bak, via les protéines dites « BH3 only », que sont Bid, PUMA et Bim. En effet, Bcl-2 ou Bcl-x_L séquestrent Bax et Bak, et via une inhibition compétitive, les protéines « BH3 only » vont libérer Bax et Bak [242] qui déclenchent le signal apoptotique. Le deuxième modèle est basé sur une activation indirecte de Bax et Bak. Les protéines « BH3 only » peuvent être séquestrées par Bcl-2, Bcl-x_L ou Mcl-1 [243], et seraient libérées par un autre groupe de protéines dites « BH3 only sensitizer », que sont les protéines Bad, NOXA et Bik [244]. Les « BH3 only » relâchées peuvent alors activer Bax et Bak et induire le signal apoptotique.

3.2.3. Mécanismes

La mitochondrie engagée dans la voie de la mort cellulaire va libérer dans le cytoplasme des molécules comme le cytochrome c, l'AIF, Smac/Diablo (*direct IAP binding protein with low pI*) [245] ou encore l'Endonucléase G [226]. En effet, la protéine cytosolique Apaf1 va oligomériser la procaspase-9 et former l'apoptosome en présence de cytochrome c et d'ATP [209, 246](figure 10). AIF possède un rôle indépendant des caspases, il se relocalise de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le noyau cellulaire où il induit un clivage de l'ADN génomique en de larges fragments (~50 kb) [247]. L'activité de l'Endonucléase G est, elle aussi, indépendante des caspases et elle est capable de participer au clivage de l'ADN génomique [226]. Les protéines de la famille IAP (*inhibitor of apoptosis protein*) sont fixées à certaines caspases et inhibent leurs activités catalytiques. Lorsque Diablo est libéré de la mitochondrie, il va neutraliser ces inhibiteurs cytosoliques par compétition [245, 248](figure 10).

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le relargage des facteurs inter-membranaires par la mitochondrie. Le premier modèle propose l'implication des protéines de la famille Bcl-2 dans la formation d'un pore dans la membrane externe mitochondriale, grâce aux deux hélices α s'étendant entre les domaines BH1 et BH2. Ainsi *in vitro*, Bcl-x_L, Bcl-2 ou Bax forment des pores dans des liposomes [249-252]. La taille de ces pores pourrait s'accroître grâce au pouvoir de polymérisation des facteurs pro-apoptotiques. En effet, Bid peut oligomériser Bak ou Bax et ces complexes permettent d'expulser des protéines comme le cytochrome c de l'intérieur des liposomes [253]. Le deuxième modèle suggère la formation de supracomplexes appelés PTP pour *permeability transition pore*. Le PTP est un « méga-pore » faisant contact entre les membranes interne et externe de la mitochondrie. Ce complexe associe le VDAC (*voltage-dependent anion channel*), localisé dans la membrane externe mitochondriale, avec l'ANT (*adenine nucleotide translocator*) et la cyclophiline D, présents dans la membrane interne [254, 255]. Ces PTP déclencheraient, lors de leur ouverture, la chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), la rupture de l'intégrité de la membrane externe et l'expulsion des facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie. La fermeture et l'ouverture de ce pore seraient contrôlées par les membres de la famille Bcl-2 anti-(Bcl-2 et Bcl-x_L) et pro-apoptotiques (Bax et Bak).

3.3. Classification des cellules en type I et type II

Il existe deux types cellulaires vis-à-vis du signal CD95 [212, 256]: les cellules dites de type I qui, suite à la stimulation de CD95, forment un DISC de façon efficace. Une fois ce DISC formé, le relargage dans le cytoplasme d'une quantité suffisante de caspase-8 active, permet le clivage et l'activation des caspases effectrices. A l'inverse, les cellules de type II forment un DISC moins efficacement. Ces cellules utilisent alors la voie mitochondriale pour amplifier le signal apoptotique CD95 (figure 11). En effet, la faible quantité de caspase-8 activée permet le clivage de la protéine Bid, en tBid (*truncated Bid*), qui se redistribue à la mitochondrie et permet la libération de facteurs apoptotiques, comme par exemple Smac/DIABLO, AIF ou l'Endo G [257, 258]. La mitochondrie semble jouer un rôle prépondérant dans les cellules dites de type II, puisque l'inhibition de la voie mitochondriale via la surexpression de Bcl-x_L ou Bcl-2, bloque le signal de mort induit par CD95 dans ces cellules [212], alors que le signal est moins affecté dans les types I. Plus récemment, il a été montré que la mort induite par CD95 dans les cellules de type II, bien que dépendante de la mitochondrie, est indépendante de l'activation de la caspase-9 par l'apoptosome, et serait sous la dépendance de protéine comme Smac/DIABLO [259, 260]. En effet, dans des cellules de type II sur-exprimant Bcl-2 ou Bcl-x_L, l'ajout d'un analogue de Smac (le composé 3) [261], permet de restaurer une sensibilité au signal [260]. Comme nous l'avons dit précédemment, Smac inhibe l'activité anti-apoptotique des IAPs (figure 10), qui semblent essentiels à la dichotomie type I/type II [259]. Cependant il existe une controverse quant au rôle de la caspase-9, puisqu'une étude précédente a montré que dans une cellule de type II déficiente pour la caspase-9, le signal CD95 est inhibé. En effet, l'absence ou l'inhibition de la caspase-9 dans ces cellules de type II, protège contre la mort induite par le signal CD95 en bloquant le clivage de la caspase-8, alors qu'à l'inverse, dans les types I, ce clivage semble indépendant de la présence de la caspase-9 [262]. Les microdomaines membranaires ont aussi été impliqués dans la différenciation type I/type II. En 2003, l'analyse de 58 lignées tumorales provenant du NCI (National Cancer Institute) a révélé que les cellules présentant des marqueurs épithéliaux se comportent comme des cellules de type II, alors que celles exprimant des marqueurs mésenchymateux sont de type I [263]. Cette étude suggère, une régulation du signal CD95 lors de la transition épithélio-mésenchymateuse, via la transition d'un type II, à un type I.

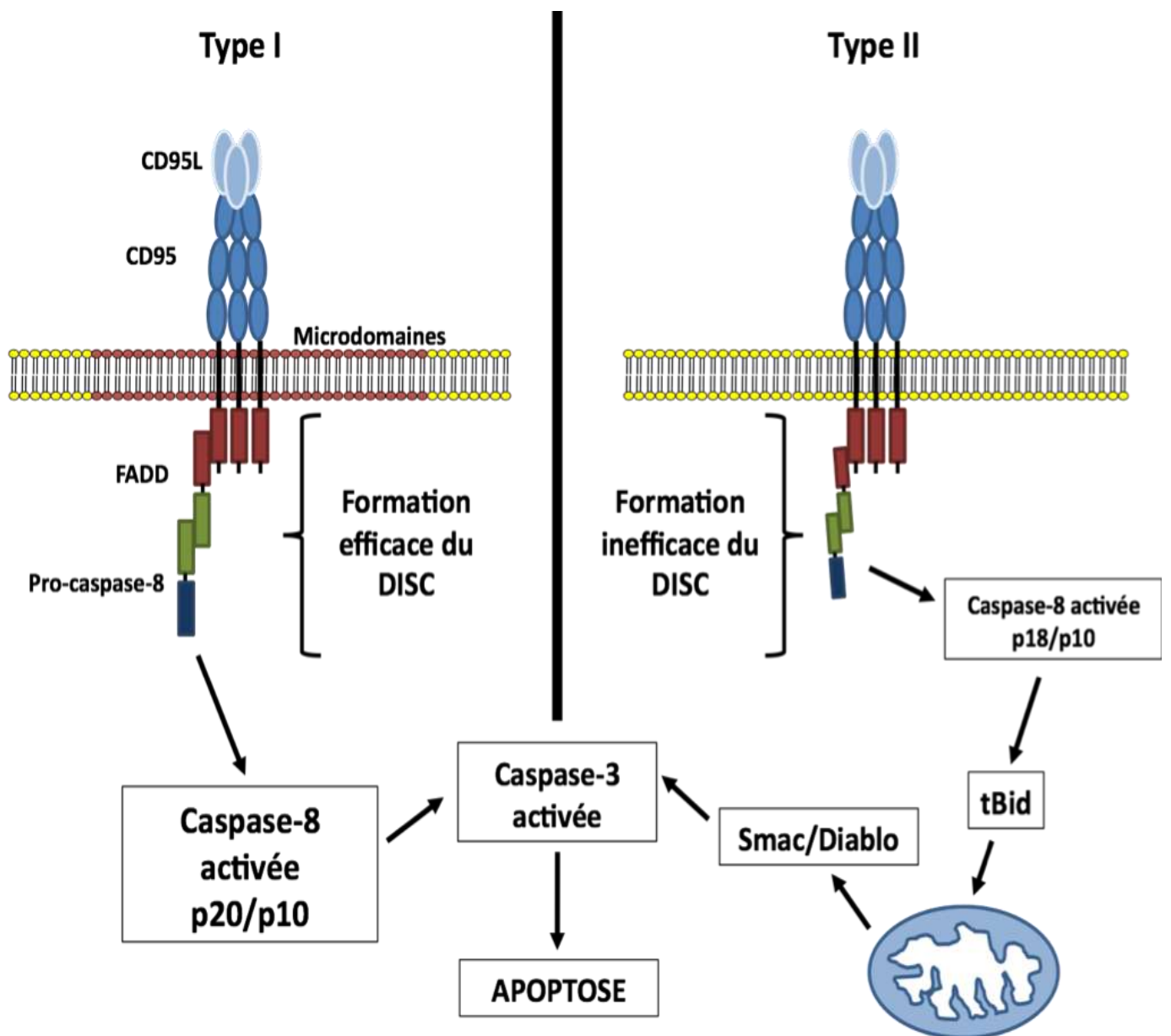


Figure 11: Description des voies apoptotiques dépendantes de CD95

3.4. Autres voies de signalisation déclenchées par CD95

3.4.1. Les voies apoptotiques

3.4.1.1. La production de céramide

La stimulation de CD95 entraîne l'activation de la sphingomyélinase acide, responsable de l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide (voir paragraphe 3.1.1) [264]. Cependant d'autres études ont démontré que la SMase n'était pas indispensable à la transmission du signal CD95 [265]. La production de céramides observées suite à la stimulation du CD95, pourrait être due à l'inhibition de la sphingomyéline synthase (responsable de la transformation du céramide en sphingomyéline) sous la dépendance des caspases [266]. Récemment, le Dr Lafont et son équipe ont montré que l'inhibition de la sphingomyéline synthase 1 (SMS1) entraîne une augmentation de la production de céramide, et amplifie l'activation des caspases et le signal apoptotique suite à la stimulation du CD95 [267]. Ainsi, ces études proposent une autre voie permettant l'augmentation intracellulaire du taux de céramide suite à l'activation du CD95, via l'inhibition de la SMS, qui serait sous la dépendance des caspases. De plus, des analogues lipidiques de synthèse comme le C₂ ou le C₁₆-céramide déclenchent, lorsqu'ils sont ajoutés de manière exogène, la mort cellulaire programmée [268, 269].

3.4.1.2. L'activation des Jun N-terminal Kinase

DAXX (*death domain associated protein*) est une molécule adaptatrice qui se fixe au domaine de mort de CD95. Le recrutement de cette protéine associe le signal CD95 à la voie de signalisation des *Jun N-terminal Kinases* (JNKs ou SAPKs) [270, 271] et déclenche un signal de mort cellulaire. Cependant le rôle exact des JNKs dans le processus apoptotique n'est pas clair car si les céramides déclenchent l'apoptose en induisant la voie des JNKs [272] des facteurs anti-apoptotiques tels que les IAPs peuvent aussi activer un de ses membres (JNK-1) et inhiber la mort cellulaire programmée [273]. De plus, l'implication des JNKs dans le déclenchement du signal apoptotique semble être restreinte à certains récepteurs apoptotiques comme le TNFR1 et pas au récepteur CD95 [274]. Donc le signal apoptotique déclenché par l'activation des JNK est assez controversé.

3.4.2. La voie nécrotique

Plusieurs études ont montré que le signal CD95 peut déclencher un signal nécrotique [275, 276]. La protéine Ser/Thr kinase RIP1 (*Receptor interacting protein 1*) est connue pour jouer un rôle dans l'activation de NF- κ B mais elle est également impliquée dans le signal nécrotique médié par CD95 [277]. La protéine RIP1 se fixe à FADD, après stimulation de CD95, et via son activité kinase, déclenche un signal nécrotique [278]. Cependant, cette protéine est un substrat de la caspase-8 [279, 280]. La protéine RIP régulerait au niveau du DISC les voies apoptotiques et nécrotiques (figure 12). Les substrats de RIP déclenchant la nécrose ne sont pas connus, mais il est possible que RIP1 interagisse directement ou indirectement avec la mitochondrie, car la production de ROS (*reactive oxygen species*) ou encore la déplétion en ATP, sont impliqués dans la nécrose [281, 282].

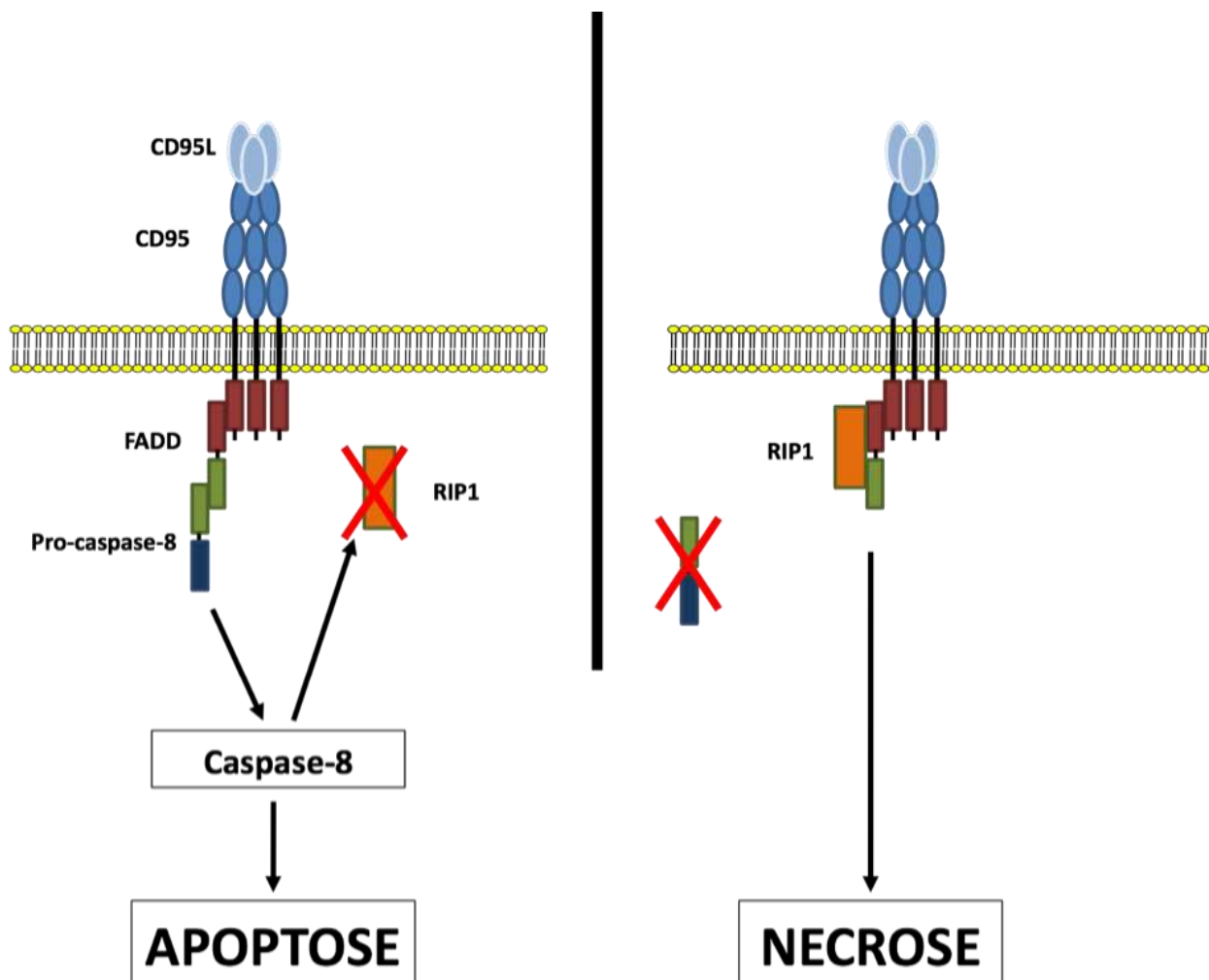


Figure 12: Représentation schématique des morts cellulaires induites par CD95.

3.4.3. Les voies n'induisant pas la mort cellulaire

Comme nous l'avons vu précédemment, le signal CD95 est capable de déclencher des signaux non-apoptotiques. Ces signaux peuvent notamment être médiés par l'activation de NF- κ B ou de la voie ERK (*extracellular signal regulated kinase*).

3.4.3.1. L'activation de NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor -kappa B*) représente un facteur clé pour la survie, la prolifération cellulaire ou encore dans l'inflammation. NF- κ B est séquestré dans le cytosol sous la forme d'un complexe avec un inhibiteur appelé I- κ B. La phosphorylation de I- κ B par le complexe kinase IKK entraîne son ubiquitinylation, puis sa dégradation par le protéasome, permettant ainsi la libération de NF- κ B. Ce dernier est alors transloqué dans le noyau où il induit la transcription de nombreux facteurs. Par exemple, NF- κ B est capable d'activer la transcription des gènes de CD95 et de CD95L. L'activation de NF- κ B par le récepteur CD95 joue un rôle dans la motilité et dans la capacité invasive de cellules tumorales, ce qui pourrait expliquer pourquoi de nombreuses cellules tumorales conservent le récepteur de mort [73]. Récemment, il a été rapporté que l'internalisation du récepteur CD95 contribue au signal apoptotique. Des cellules exprimant un récepteur CD95 muté sur la tyrosine 291 (Y291F) n'est plus internalisable mais fixe toujours FADD. Ces cellules sont moins sensibles à l'apoptose CD95 et les voies de signalisation non-apoptotiques médiées par NF- κ B sont exacerbées dans ces cellules. Ainsi, en suivant le modèle du TNFR1, les auteurs proposent que les premières étapes qui suivent la fixation de CD95L sur son récepteur conduisent aux voies non-apoptotiques et que l'internalisation du récepteur est requise pour la transmission d'un signal de mort efficace [177].

3.4.3.2. *La voie ERK*

ERK est une sérine/thréonine kinase activée par MEK1 (MAPK/ERK kinase1). La fixation de CD95L sur son récepteur conduit à la phosphorylation rapide de ERK [283]. L'activation de cette voie de signalisation conduit, d'une part, à l'inhibition de l'apoptose [60], et d'autre part à la prolifération des cellules [283].

3.4.3.3. *La voie PI3K/Akt*

Il a récemment été montré que la stimulation du CD95 par le CD95L dans des glioblastomes, accentuait le pouvoir invasif des ces tumeurs via l'activation de la voie Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt (voir paragraphe 5) [284]. En effet, suite la fixation du ligand, le CD95 va recruter la protéine Yes qui appartient à la famille des Src kinases, ainsi que la sous-unité régulatrice de la PI3K, la p85. Cette association déclenche la voie PI3K/Akt, responsable de l'expression de MMPs (*matrix metalloproteinase*), indispensables au pouvoir invasif de ces tumeurs [284].

3.5. Les inhibiteurs de l'apoptose

3.5.1. *Les molécules régulatrices d'origine cellulaire*

3.5.1.1. *c-FLIP*

Le gène de c-FLIP est localisé sur le chromosome 2 (2q33), à proximité des gènes de la caspase-8 et de la caspase-10. La colocalisation de ces trois gènes indique une origine commune avec une duplication d'un gène ancestral. c-FLIP est exprimé dans de nombreux tissus mais de manière plus abondante dans le cœur, les muscles squelettiques, les organes lymphoïdes et les reins. Les souris knock-out pour le gène de c-FLIP meurent précocement *in utero* et présentent des défauts du développement cardiaque. Les fibroblastes embryonnaires issus de ces souris sont très sensibles à l'apoptose induite par CD95L ou TNF [285].

La protéine c-FLIP, autrement nommée CASH/FLAME1/Casper/CLARP/I-FLICE/MRIT/ ou usurpine, existe sous trois formes, une longue et deux courtes (55 et 26 kDa respectivement)

générées par épissage alternatif. La forme longue (c-FLIP_L) contient deux DED dans sa région amino-terminale et la région carboxy-terminale est homologue à celle de la caspase 8. Cette région est mutée sur des acides aminés impliqués dans le site catalytique, ce qui conduit à une absence d'activité enzymatique. Les formes courtes (c-FLIP_S et c-FLIP_R) contiennent uniquement les deux DED suivis d'une courte région de 20 acides aminés sans homologie avec la caspase 8. c-FLIP peut se fixer à la caspase 8 et à FADD [voir figure 13 [286]].

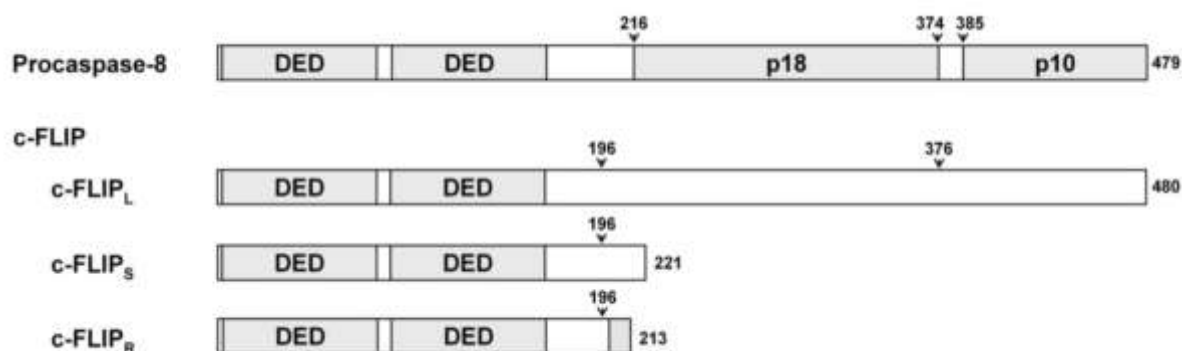


Figure 13: Les différentes formes de c-FLIP.

D'après Yang, Yonsei Med J, 2008

Lors de l'activation du récepteur CD95, les trois formes de la protéine c-FLIP peuvent être recrutées au niveau du DISC avec la caspase 8, la caspase 10 et FADD. Lors du recrutement de c-FLIP_S ou de c-FLIP_R, un hétérocomplexe procaspase 8/ c-FLIP_S ou procaspase-8/c-FLIP_R se forme et la procaspase 8 ne peut plus effectuer la première étape de son auto-clivage. Le rôle de c-FLIP_L est plus complexe : il a été récemment démontré qu'il était pro- ou anti-apoptotique selon sa concentration dans le DISC. L'hétérodimère c-FLIP_L/caspase-8 (ou -10) est un complexe possédant des propriétés enzymatiques identiques à celles de l'homodimère de caspase [287, 288]. Ainsi, à forte expression, c-FLIP_L bloque le DISC alors qu'il est capable de promouvoir son activation à faible concentration [289, 290]. c-FLIP peut être clivé au sein de l'hétérodimère qu'il forme avec la caspase 8, produisant notamment un

fragment p43 [291]. Cette forme semble être plus efficace que c-FLIP_L pour recruter TRAF2 et ainsi induire la voie de survie NF-κB du récepteur au TNF [292]. Ce rôle de c-FLIP dans l'activation de la survie cellulaire ne semble pas pouvoir être directement applicable à la signalisation dépendante du récepteur CD95 puisque plusieurs auteurs ont démontré dans ce contexte un rôle strictement inhibiteur de c-FLIP dans l'activation de NF-κB [73, 293, 294]. Les fonctions exercées par c-FLIP sont résumées dans la figure 14 [295].

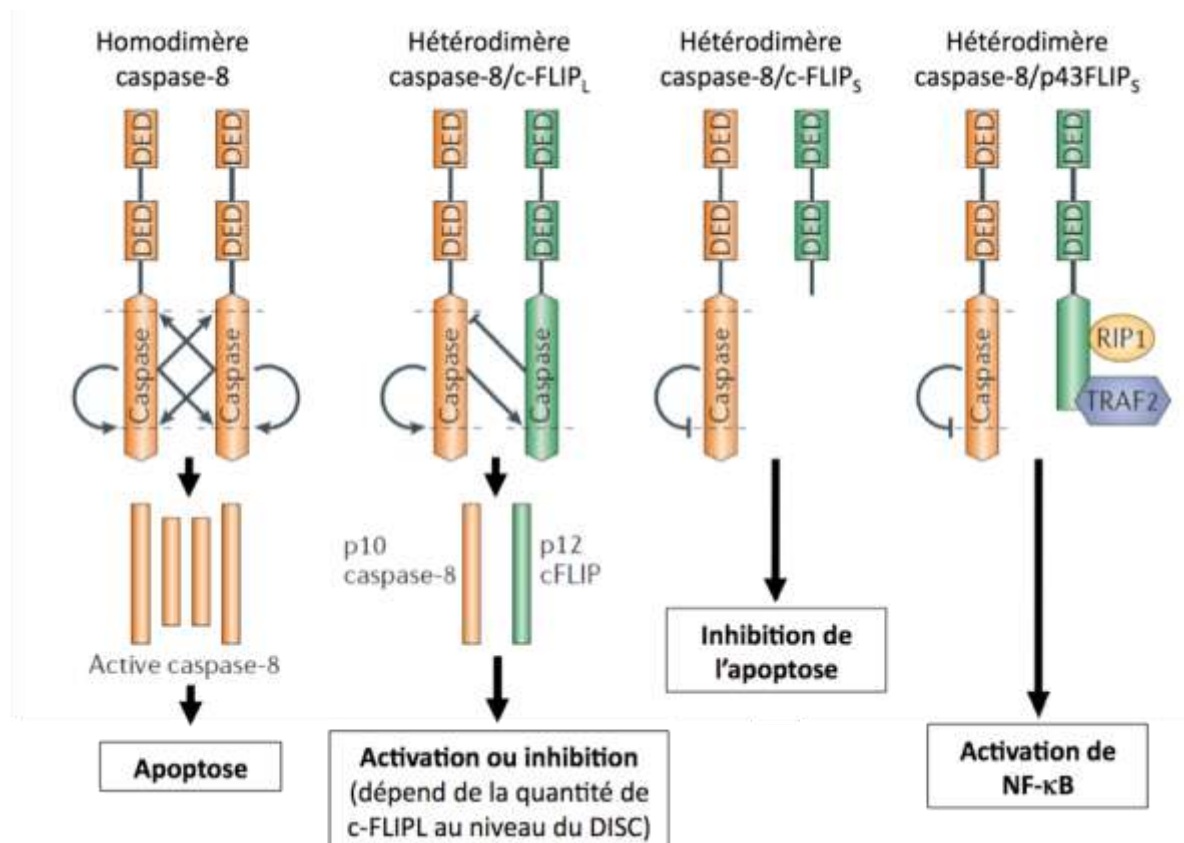


Figure 14 : Les différentes formes de c-FLIP.

D'après Budd et al, Nat Rev Immunol, 2006.

3.5.1.2. Les IAPs

Les IAPs appartiennent à une famille de protéines dont 8 gènes ont été identifiés dans les cellules de mammifères [296]. Ces protéines possèdent des domaines BIRs (*Baculovirus IAP repeats*), homologues avec les domaines présents dans la protéine IAP découverte à l'origine chez le Baculovirus. La présence de ce domaine signe l'appartenance à la famille des IAPs. Certaines protéines de la famille possèdent également un domaine appelé RING (Really Interesting New Gene). Ce sont des protéines cytosoliques. Le prototype de cette famille est XIAP (*X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein*). Il est capable d'inactiver la caspase-9 et les caspases -3 et -7 par liaison via deux domaines distincts [297]. Le domaine BIR3 se lie à la petite sous-unité de la caspase 9, empêchant son homo-dimérisation et induisant un changement de conformation de son site catalytique [298-301]. La protéine Smac/DIABLO possède le même site de liaison à XIAP que la caspase 9. Ainsi, lorsqu'il est libéré de la mitochondrie, il est capable de déplacer l'interaction caspase 9 / XIAP, favorisant alors la formation de l'apoptosome. L'inhibition des caspases -3 et -7 passe par la fixation du domaine BIR2 de XIAP à la caspase 3 [302] ou 7 [216], ce qui empêche la fixation des substrats par un encombrement stérique. Le domaine RING des protéines IAPs permet l'ubiquitinylation du complexe caspase/IAP et ainsi sa dégradation par le protéasome [303].

3.5.1.3. La protéine PED/PEA-15

PED/PEA-15 (*Phosphoprotein enriched in diabetes*) est une protéine de 15kDa exprimée de façon ubiquitaire, qui contient un domaine DED. Cette protéine est impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires, et notamment un rôle anti-apoptotique. Lorsque PED/PEA-15 est phosphorylée sur sa sérine 116, ce facteur est capable d'inhiber la mort induite par CD95, en prévenant la formation du DISC, via son association à FADD [304, 305]. Ainsi, l'inhibition de la phosphorylation de PED/PEA-15 par Akt permettrait la transition des cellules de type II vers des cellules de type I [306].

3.5.2. Les protéines virales

- *v-FLIP*

v-FLIP est produit par les γ herpesvirus et le rhadinovirus du macaque rhésus (RRV) [307]. Le molluscipoxvirus produit deux autres variants possédant une partie carboxy-terminale légèrement différente [308]. Tous contiennent deux domaines DED qui se lient à FADD et à la caspase-8 et inhibent le signal apoptotique [309] (figure 15).

- *CrmA*

CrmA (*cytokine response modifier gene*) [310] est une protéine synthétisée de manière précoce lors de l'infection par le virus de la vaccine. CrmA inhibe l'activité protéolytique des caspases 1 et 8 [311]. Les poxvirus échappent à la destruction par le système immunitaire en inhibant la mort cellulaire de la cellule hôte mais aussi indirectement en régulant la réponse inflammatoire par l'inhibition de la caspase-1 et ainsi la maturation et la sécrétion d'IL1 β et d'IL18 [312].

- *p35*

p35 est une protéine exprimée par les baculovirus, elle est clivée par certaines caspases et le produit de clivage p25 se fixe irréversiblement au niveau du site catalytique de l'enzyme [313]. Cette protéine inhibe une grande variété de caspases, comme les caspases -1, -3, -6, -7 et -8 [314]. CrmA et p35 sont des inhibiteurs compétitifs, c'est-à-dire qu'ils se fixent dans le site catalytique de la caspase et inhibent ainsi l'activité protéolytique (figure 15).

- *v-IAP*

Les IAPs décrits plus haut (paragraphe 3.5.1.2) ont un homologue exprimé par les baculovirus [315]. Les caspases effectrices comme les caspases -3 et -7 ou la caspase initiateuse -9 sont inhibées par v-IAP (figure 15).

- La glycoprotéine J

La glycoprotéine J du virus de l'Herpès (HSV) est capable d'inhiber l'apoptose induite par CD95 ou par le Granzyme B : ceci est dépendant de l'inhibition des caspases. Son mécanisme d'action reste encore à préciser [316].

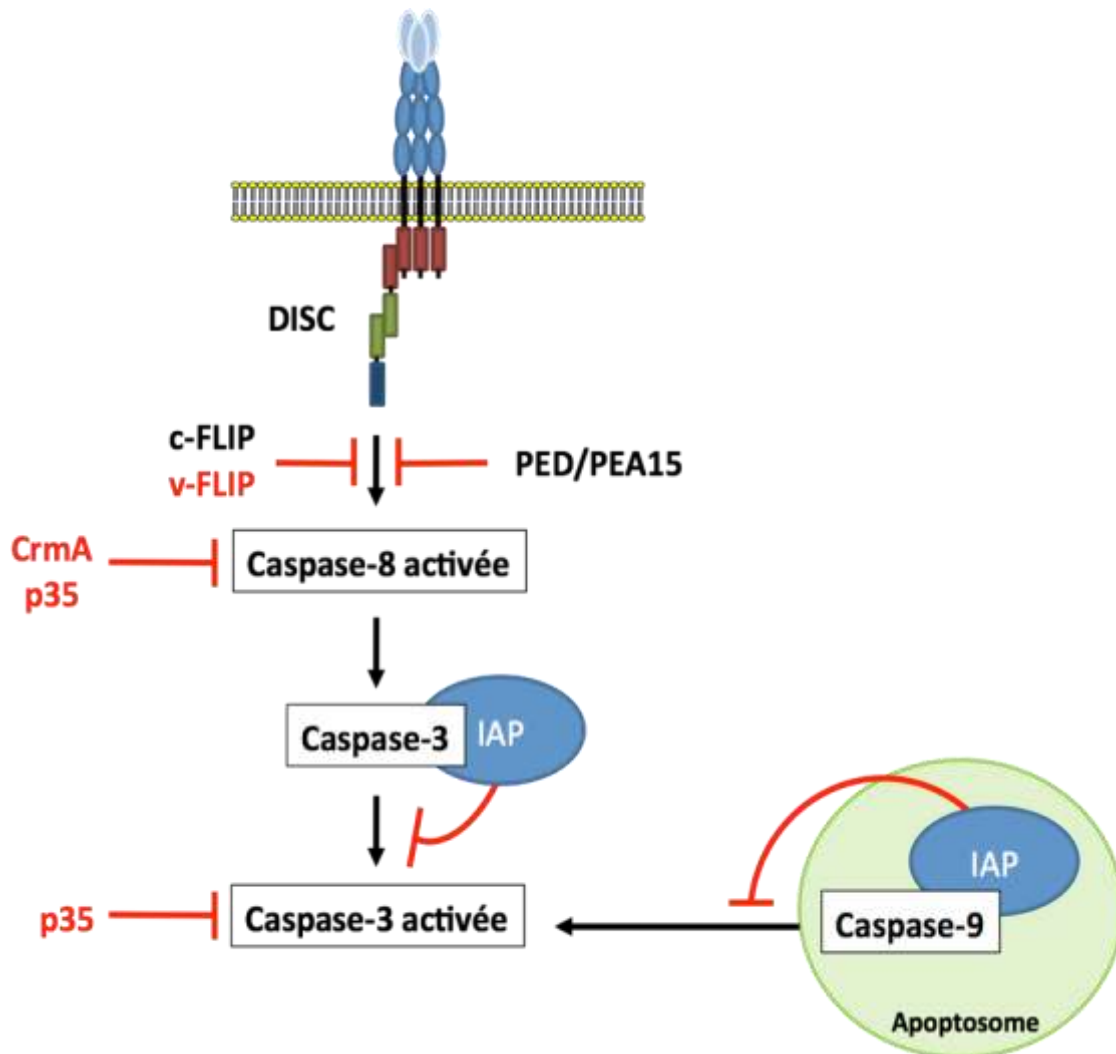


Figure 15 : Les molécules inhibitrices de l'apoptose

Les inhibiteurs en rouge sont d'origine virale, ceux en noir sont des protéines cellulaires. La famille des IAPs possède des membres d'origine virale et cellulaire.

3.5.3. Les peptides inhibiteurs

Des peptides contenant la séquence de clivage d'une caspase et modifiés chimiquement présentent la propriété d'inhiber l'activité enzymatique de cette caspase en se fixant dans son site catalytique de manière réversible ou irréversible. En effet, la séquence peptidique peut être couplée soit à une fonction aldéhyde (R-CHO) soit à une fonction cétone (R-CO-R'). Les dérivés aldéhydiques sont des inhibiteurs réversibles, tandis que les composés méthylcétones forment une liaison irréversible avec la cystéine du site actif des caspases et sont des inhibiteurs irréversibles. Ces peptides traversent passivement la membrane cytoplasmique et inhibent les caspase lors de son processus d'activation. Certaines séquences n'ont aucune spécificité et bloquent toutes les caspases (VAD pour Val-Ala-Asp) sauf la caspase-2 (peu efficace) [317], et d'autres sont spécifiques d'une caspase particulière (LEHD inhibe préférentiellement la caspase 9, DEVD la caspase 3 et IETD la caspase 8).

4. Les microdomaines

4.1. Caractéristiques

Les microdomaines ou radeaux lipidiques sont des structures protéo-lipidiques enrichies en sphingolipides et en cholestérol qui flottent au sein de la membrane cytoplasmique. Ces structures concentrent sur leur feuillet extracellulaire des protéines possédant une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI), et du côté intracellulaire, de nombreuses protéines impliquées dans la transduction du signal comme les kinases de la famille src (Lck et Fyn, notamment). Il existe un tri protéique et lipidique au niveau de l'appareil de Golgi, permettant la concentration ou l'exclusion de protéines au sein de ces structures lipidiques [318]. Ces microdomaines ont été conservés au cours de l'évolution, on les retrouve notamment chez la drosophile [319], le dictostélium ou la levure [320].

D'autres microdomaines appelés caveolae ont été caractérisés [321]. Comme les microdomaines, ils concentrent le cholestérol, les sphingolipides et les protéines-GPI mais ils contiennent en plus une protéine structurale essentielle pour leur formation : la cavéoline. Ces domaines sont impliqués dans l'endocytose [322], la transcytose [323] ou la potocytose [324] ainsi que dans la transduction de signaux cellulaires [325]. Cependant à l'opposé des radeaux

lipidiques, les caveolae ne sont pas ubiquitaires et les lymphocytes T n'en possèdent pas [326].

Les microdomaines ont des propriétés physico-chimiques différentes du reste de la membrane plasmique du fait de leur composition lipidique particulière. Ces domaines sont très compacts et ordonnés ce qui les rend insolubles à 4°C par des détergents non ioniques tel que le Triton X-100. De plus la concentration de longues chaînes d'acides gras saturés (pas de double liaison entre les chaînes carbonées) confère à ses domaines une très faible densité ce qui permet leur séparation du reste des membranes après lyse cellulaire et ultracentrifugation dans un gradient de saccharose. Ces radeaux lipidiques qui flottent alors à une densité plus faible que le reste des membranes lipidiques peuvent ainsi être isolés et analysés.

4.2. Composition chimique

Des expériences de reconstitution de membrane lipidique composée principalement de glycérophospholipides ont démontré que l'ajout de cholestérol et de sphingolipides aux concentrations présentes dans la bicouche lipidique *in vivo* favorise la formation de régions lipidiques compactées et ordonnées. Ces expériences tendent à prouver que les caractéristiques des microdomaines dépendent des composants lipidiques qui les forment. Par exemple, la présence de chaînes hydrocarbonées dans les sphingolipides permet au cholestérol de s'insérer entre ces chaînes, entraînant la formation d'une phase « liquide ordonnée », qui flotte au sein d'une phase « liquide fluide ».

- *Les sphingolipides*

Dans cette famille sont représentés en forte proportion, les glycosphingolipides de type monosialogangliosides (GM1 et GM3) et des phospholipides comme la sphingomyéline.

- *Le cholestérol*

Le cholestérol confère à ces domaines leur structure compacte et insoluble [327]. Ce cholestérol est concentré dans le feuillet externe de la membrane cytoplasmique. La composition du feuillet interne des microdomaines est beaucoup moins bien caractérisée.

4.3. Composition protéique

4.3.1. Protéines glycosylphosphatidylinositol (GPI)

La partie carboxy-terminale des protéines-GPI contient une séquence peptidique clivée dans le réticulum endoplasmique et remplacée par l'ancre GPI. C'est une structure glycolipidique qui permet l'ancrage de la protéine à la surface externe de la membrane plasmique, dans les microdomaines [328]. Les protéines-GPI comme le CD55 (*decay accelerating factor*) [329] ou le CD59 [330] permettent la transduction d'un signal d'activation lors de leur co-ligation avec le TCR. Le lien entre l'agrégation de la protéine extracellulaire et le signal d'activation intracytoplasmique s'explique par la concentration des protéines-GPI et des messagers intracellulaires dans les microdomaines.

4.3.2. Protéines transmembranaires

Les microdomaines des lymphocytes T contiennent des protéines transmembranaires, comme le CD5 et le CD9 qui sont capables d'amplifier le signal dépendant du CD3 [331]. Le CD28 ou le LFA-1 [332] au repos semblent localisés à l'extérieur des radeaux lipidiques. Cependant lors de la co-ligation du CD28 ou du LFA-1 avec le TCR, ces deux récepteurs permettent le recrutement des microdomaines et s'y retrouvent concentrés [329, 333]. Une fraction des molécules CD4 et des molécules CD8 est localisée dans les microdomaines [334, 335]. Leur agrégation permettrait de rapprocher les radeaux lipidiques des TCRs.

4.3.3. Messagers intracytoplasmiques

Les tyrosines kinases de la famille Src comme Lck ou Fyn sont concentrées dans les microdomaines et leur localisation est dépendante de leur acylation [336, 337]. Une protéine adaptatrice acylée, LAT (*linker for activation of T cell*) est localisée aussi dans les microdomaines [338]. Lorsque cette protéine est phosphorylée, elle sert de protéine scaffold pour l'induction de nombreuses voies de signalisation (comme la phospholipase C γ 1 et la PI3K).

4.4. Microdomaines et signal CD95

Les microdomaines participent à la signalisation apoptotique induite par CD95. En effet, le recrutement du récepteur CD95 dans les microdomaines permet une amplification du signal de mort dans les lymphocytes T CD4⁺ activés [339]. Garofalo et ses collaborateurs ont mis en évidence que le DISC est formé dans les radeaux lipidiques des cellules leucémiques T humaines CEM et que les gangliosides GM3 et GM1 peuvent être co-immunoprécipités avec la caspase-8 [340]. D'autre part, dans les thymocytes murins, une partie des récepteurs CD95 au repos est retrouvée dans les microdomaines et la formation du DISC est dépendante de ces domaines [169]. Plus récemment, le groupe de Siegel a mis en évidence que, dans les cellules de type I, le signal de mort déclenché par le récepteur CD95 est dépendant des microdomaines [128]. Ils montrent également que les lymphocytes T activés se comportent comme des cellules de type II et une transition vers type I est observée après leur restimulation par l'antigène. Ainsi, les microdomaines sont décrits comme étant des structures membranaires permettant l'amplification du signal apoptotique émanant du CD95.

Notre groupe a contribué à l'étude du rôle des radeaux lipidiques dans le signal CD95, en montrant que la localisation forcée de CD95 dans les microdomaines permet d'amplifier le signal de mort dans les cellules de type II. En effet, l'expression d'une protéine chimérique comprenant la région extracellulaire du CD95 associée à une séquence d'ancrage GPI est retrouvée concentrée dans les radeaux lipidiques. Elle permet d'amplifier le signal de mort grâce à la relocalisation de l'ensemble des molécules CD95 endogènes dans les microdomaines [341]. De plus, le co-engagement de CD95 avec CD28, un récepteur membranaire connu pour recruter les microdomaines lors de l'activation des lymphocytes T [329], conduit à la redistribution de CD95 dans les radeaux lipidiques et l'amplification du signal apoptotique [180]. D'autre part, nous avons mis en évidence qu'au contraire, la co-stimulation de CD95 et de la molécule CD59 conduisait à une diminution de l'apoptose et que CD59 n'était pas co-localisé avec le CD28, suggérant l'existence de plusieurs types de microdomaines, activateurs et inhibiteurs [181].

Cremesti et ses collaborateurs ont établi un lien de cause à effet entre la production de céramide, qui suit la stimulation du récepteur CD95, et le regroupement des récepteurs dans les microdomaines, en démontrant que l'élévation de la quantité de céramide précède l'agrégation du récepteur et sa distribution dans les radeaux lipidiques [175]. De plus, la sphingomyélinase acide (aSMase) se relocalise du cytoplasme aux radeaux lipidiques lors de

la stimulation de CD95, et ainsi induit la production de céramides à partir de la sphingomyéline [342]. De façon intéressante, des agents anticancéreux comme l'édelfosine [343, 344], ou le resvératrol [345] ont la capacité de concentrer CD95 dans les microdomaines, et d'induire un signal apoptotique CD95 indépendamment du CD95L. Il est intéressant de noter que l'édelfosine inhibe la voie PI3K/Akt [346].

5. La voie PI3K/Akt

5.1. La famille des PI3Ks

La famille des phosphoinositides 3-kinase (PI3K) catalysent le transfert d'un groupement phosphate en position 3 du cycle inositol d'un phosphoinositides (PIP) (figure 16). Les PI3Ks peuvent phosphoryler le phosphatidylinositol (PI), le PI(4)P (monophosphorylé) et le PI(4,5)P₂ (biphosphorylé) respectivement en PI(3)P, PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃.

Les membres de la famille des PI3Ks sont repartis en trois classes sur la base de leurs substrats spécifiques, leur structure et leur mécanisme de régulation [347] (figure 16).

5.1.1. Les sous-unités catalytiques

Il existe 8 sous-unités catalytiques possédant une activité PI3K. Toutes ces sous-unités comportent un domaine PIK (*PI Kinase*) de fonction mal connue, un domaine C2 capable de se fixer aux phospholipides et le domaine catalytique. Les classes I_A, I_B, et II ont également en commun le RBD (*Ras binding domain*) dans la partie amino-terminale (figure 16).

5.1.2. Les PI3Ks de classe I

Les PI3Ks de classe I sont des hétérodimères constituées d'une sous-unité régulatrice de 50 à 90 kDa et d'une sous-unité catalytique de 110 kDa. Elles sont capables de phosphoryler les PI, PI(4)P et PI(4,5)P₂ en position 3 du noyau inositol, *in vitro* et préférentiellement le

PI(4,5)P₂ *in vivo* [348, 349] (figure 16). On en distingue 2 sous-classes en fonction de la nature de leurs différentes sous-unités et de leur mode d'activation. La classe IA est associée aux tyrosines phosphorylées (via des adaptateurs) et à la GTPase Ras, et la classe IB aux protéines G hétérotrimériques.

5.1.2.1. La classe I_A

Les sous-unités catalytiques des PI3Ks de classe IA sont aux nombres de 3 codées par 3 gènes : *Pik3ca* qui code pour p110 α , *Pik3cb* qui code pour p110 β et *Pik3cd* qui code pour p110 δ hématopoïétique [350]. Ces 3 isoformes contiennent à leur extrémité N-terminale un domaine de liaison à la sous-unité régulatrice.

La caractéristique de cette sous-classe réside dans les sous-unités régulatrices associées qui possèdent des domaines SH2 (*Src Homology 2*) reconnaissant des motifs phosphorylés sur Tyrosine (Y(P)xxM). On connaît 5 isoformes majeures de la sous-unité régulatrice des PI3Ks de classe IA : p85 α , p55 α et p50 α , p85 β et p55 γ (cerveau et testicule). Toutes ces isoformes partagent une région C-terminale formées par 2 domaines SH2 encadrant une région dites inter-SH2 (iSH2) qui est la zone d'interaction entre la sous-unité régulatrice et la p110 [351, 352]. Les différences entre ces 5 isoformes se retrouvent donc dans la région N-terminale, qui contient pour les 2 p85 (α et β), un domaine SH3 et un domaine BH (*Bcr Homology*) encadré par 2 régions PR (*Prolin Rich*) [353](figure 16).

5.1.2.2. La classe I_B

On ne connaît qu'une seule PI3K de classe I_B. Elle est formée de la sous-unité catalytique p110 γ et de la sous-unité régulatrice p101. La sous-unité régulatrice de la PI3K I_B, p101 ne possède aucune homologie avec les sous-unités régulatrices de la classe I_A, et possède un domaine de liaison aux récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques [350](figure 16).

5.1.3. Les PI3Ks de classe II

Contrairement aux PI3Ks de classe I et III les PI3K de classe II sont des monomères d'environ 170 kDa: les PI3K-C2. On en connaît 3 isoformes PI3K-C2 α , PI3K-C2 β qui sont ubiquitaires et PI3K-C2 γ qui est principalement exprimée dans le foie [350]. Cette famille de PI3Ks est caractérisée par un domaine C2 supplémentaire en C-Terminal et un domaine PX (*Phox* homology) (figure 16). Leurs substrats préférentiels, *in vitro*, sont le PI et le PI(4)P mais pas le PI(4,5)P₂ [347]. Les rôles précis de cette classe de PI3K ne sont pas encore très clairs, mais elle semble jouer un rôle dans le trafic vésiculaire et l'endocytose clathrine-dépendants [354].

5.1.4. Les PI3Ks de classe III

La PI3K de classe III est un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique homologue de la protéine de levure Vps34p (*Vacuolar-protein-sorting 34 protein*) [355] et d'une sous-unité régulatrice à activité Ser/Thr kinase, la p150. Les PI3Ks de classe III ont pour seul substrat spécifique, le PI [356]. La région N-terminale de Vps34p ne contient pas de RBD (*Ras binding domain*). La PI3K de classe III joue un rôle dans le trafic intracellulaire [357] mais également dans l'autophagie [358] (figure 16).

5.1.5. Activation et fonction des PI3K I_A

5.1.5.1. Activation

L'activation des PI3Ks de classe IA est causée par de nombreux signaux d'origines diverses comme par exemple :

- les récepteurs à activités tyrosine kinase, comme les récepteurs à l'EGF (*epidermal growth factor*) ou du NGF.
- Des récepteurs couplés à des activités tyrosine kinase cytoplasmique tels que les récepteurs aux cytokines à quatre hélices alpha (hématopoïétines), aux interférons.
- Des récepteurs couplés aux protéines G

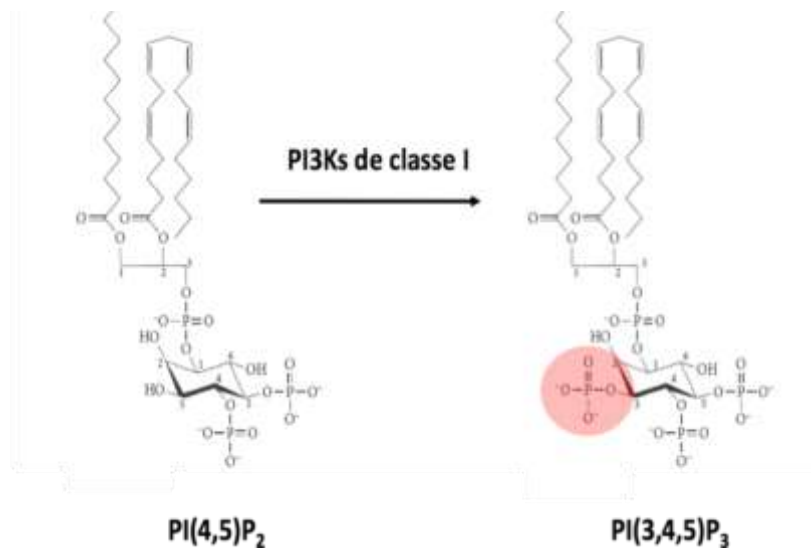
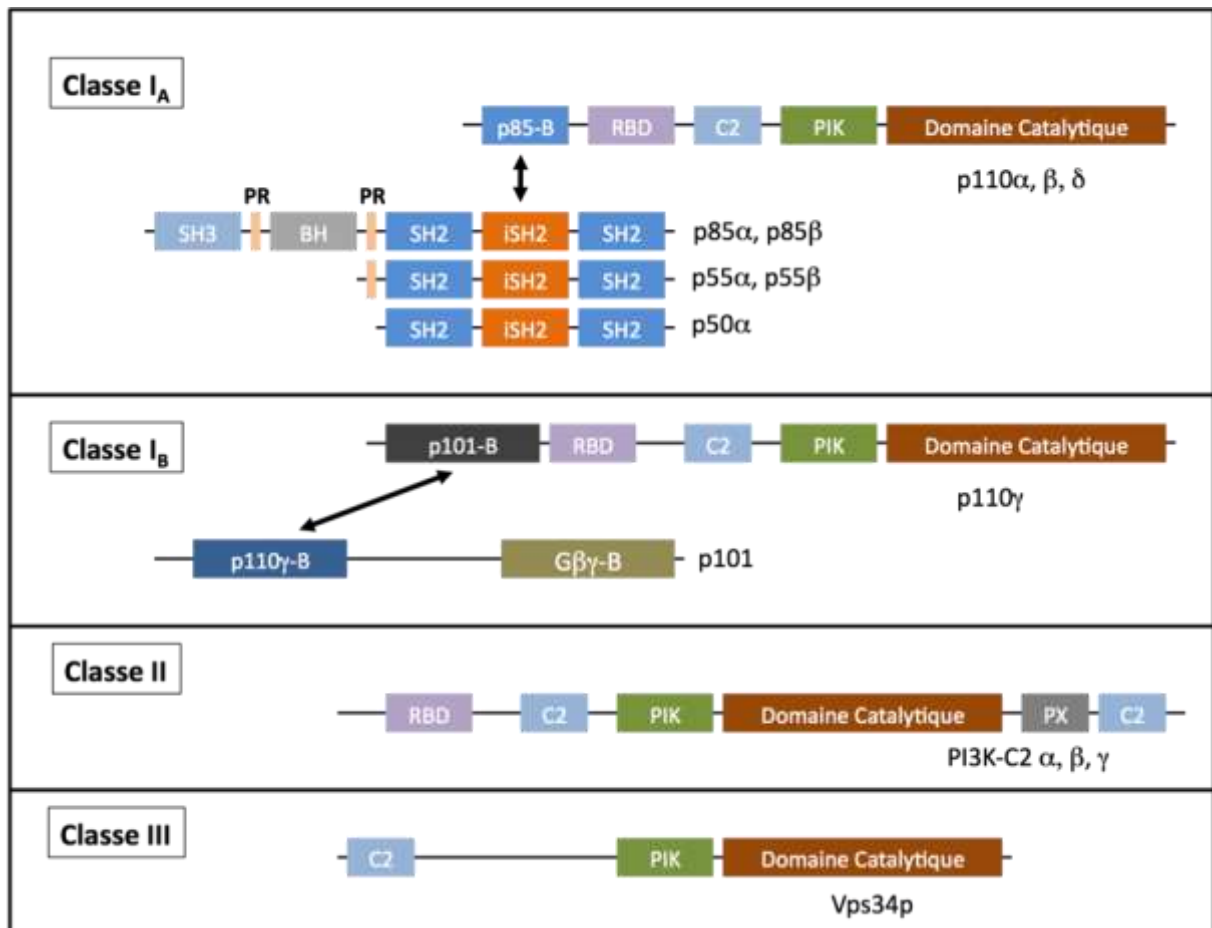


Figure 16 : La famille des PI3K et la formation du PI(3,4,5)P₃

PIK (*PI Kinase*) ; RBD (*Ras binding domain*) ; p85-B (*p85 binding domain*) ; SH2 (*Src homology domain*) ; iSH2 (*domaine interSH2*) ; PR (*Prolin rich region*) ; BH (*Bcr homology*) ; SH3 (*Src homology 3*) ; D'après Liu et al, *Drug Discovery*, 2009.

5.1.5.2. Les fonctions

Les PI3K I_A sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires en produisant les PI(3,4,5)P₃ qui permettent le recrutement local de protéines possédant des domaines PH.

5.1.6. La régulation des PI3Ks I_A

5.1.6.1. Le complexe p85/p110

L'interaction entre la sous-unité catalytique (p110) et la sous-unité régulatrice (p85) se fait au niveau de la région inter-SH2 (iSH2) des p85 [359] et de la région N-terminale de p110 [360]. En absence de stimulation, la p85 interagit avec la p110 dans le cytosol, permettant l'inhibition de son activité catalytique [361, 362]. Cette inhibition nécessite la présence du domaine nSH2 (en position N-Terminale) [360]. De plus, dans cette configuration, p85 empêche l'activation de la p110 par Ras via son RBD (*Ras Binding Domain*) [363].

p85 peut réguler la disponibilité de p110 [364, 365]. Il a été montré que p85 peut s'homodimériser via des interactions entre son domaine SH3 et son motif PR (*Prolin rich motif*) N-terminal et via des interactions BH-BH (*Bcr homology*) [366]. Dans le contexte de la signalisation de l'insuline, les monomères de p85 peuvent entrer en compétition avec les complexes p85/p110 pour les motifs tyrosines phosphorylés de l'adaptateur, IRS (*Insulin Receptor Subunit*) aussi bien *in vitro* [367] qu'*in vivo* [368].

La phosphorylation de résidus tyrosines sur les récepteurs ou protéines « scaffolds » membranaires permet le recrutement du complexe p85/p110 à la membrane [369-372]. Cette interaction des domaines SH2 de p85 avec les motifs contenant une tyrosine phosphorylée est responsable de changements conformationnels qui augmentent l'activité catalytique de la p110 [373] et autorise son activation par Ras [363, 374]. De plus, p85 peut être phosphorylée sur sa tyrosine 688 par les kinases de la famille Src, Lck ou Abl [375], et cette phosphorylation semble jouer un rôle dans la levée d'inhibition de la p85 sur la p110, entraînant une augmentation de l'activité de la p110 [376-378].

5.1.6.2. La PI 3-phosphatase, PTEN

La protéine PTEN (*Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*), aussi appelée MMAC1 (*Mutated in Multiple Advanced Cancers*) possède une double activité enzymatique, protéine phosphatase et lipide phosphatase, cette dernière étant essentielle à sa fonction suppresseur de tumeur [379]. *In vitro*, PTEN déphosphoryle en position 3 du cycle inositol, le PI(3)P, le PI(3,4)P₂ et le PI(3,4,5)P₃ ainsi que l'I(1,3,4,5)P₄ mais son substrat préférentiel *in vivo* reste le PI(3,4,5)P₃ [350, 380]. Cette activité lipide phosphatase fait de PTEN l'antagoniste des PI3Ks de classe I [379]. PTEN est délétée ou mutée dans près de 50% des cancers [381, 382], mais aussi dans d'autres pathologies comme l'autisme [383] ou les pathologies cardiovasculaires [384]. Dans des lignées cellulaires tumorales dépourvues de PTEN, ainsi que dans des lignées cellulaires dérivées de souris knock-out (KO) pour PTEN, les niveaux de PI(3,4,5)P₃ et de PI(3,4)P₂ sont élevés par rapport aux cellules contrôles [385]. L'augmentation des niveaux de PI(3,4,5)P₃ et de PI(3,4)P₂ dans ces cellules s'accompagne d'une activation d'Akt et la réintroduction de PTEN entraîne une inhibition d'Akt et d'autres cibles de la PI3K [385, 386].

5.1.6.3. La PI 5-phosphatase SHIP

La famille des Phosphatases SHIP contient 2 membres, SHIP1 (hématopoïétique) et SHIP2 (ubiquitaire). Les protéines SHIP sont des PI 5-phosphatases qui hydrolysent le PI(3,4,5)P₃ en PI(3,4)P₂ et l'I(1,3,4,5)P₄ en I(1,3,4)P₃ *in vitro* [387-389]. *In vivo*, leur substrat préférentiel est le PI(3,4,5)P₃ [390-392]. Dans les lymphocytes B, SHIP1 est associée à la régulation négative du co-engagement du BCR (B-Cell Receptor) et du récepteur du fragment Fc des IgG, le FcγRIIB (Fcγ fragment Receptor IIB) par l'antigène et les IgG sécrétées [388, 393, 394]. Dans ce contexte, SHIP est recrutée au niveau de motifs tyrosines phosphorylés, les ITIMs (*immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition motif*) situés dans le domaine cytoplasmique du FcγRIIB. Ce recrutement à la membrane induit une diminution de la quantité de PI(3,4,5)P₃, ce qui réduit l'activation de Btk, de PLCγ [388], mais aussi d'Akt [395]. SHIP2 est capable de remplir les mêmes fonctions que SHIP1 dans les lymphocytes B et ce, même en absence de SHIP1 [390].

5.1.6.4. Les inhibiteurs chimiques

Plusieurs inhibiteurs pharmacologiques plus ou moins spécifiques de la PI3K ont été décrits. Les plus couramment utilisés sont le LY294002 [396] et la Wortmannine [397]. La Wortmannine et le LY294002 sont également capables d'inhiber d'autres enzymes de la super-famille des PI3Ks, et notamment les DNA-PK.

- Le LY294002

Le LY294002 est un dérivé flavonoïde, inhibiteur réversible de la PI3K ($IC_{50} = 0,5/1,5 \mu M$ et $K_i = 1 \mu M$), via sa fixation au site de liaison à l'ATP, capable d'inhiber toutes les enzymes de classe I.

- La Wortmannine

La wortmannine est un composé d'origine fongique (*Penicillium funiculosum*), qui inhibe de façon irréversible la PI3K ($IC_{50} = 2-5 nM$), en modifiant de façon covalente un résidu lysine présent dans le domaine catalytique de la p110, qui est critique pour son activité.

5.2. La kinase Akt

5.2.1. Caractéristiques

Chez l'homme, 3 gènes ont été identifiés codant pour 3 protéines Akt: Akt1/PKB α , Akt2/PKB β , Akt3/PKB γ . La famille des kinases Akt est très conservée dans l'évolution. Elle présente près de 95% d'identité en acides aminés entre le rat, la souris et l'homme et 60% entre l'homme et *C. elegans*. Les 3 isoformes d'Akt sont exprimées différemment en fonction des tissus. En effet, Akt1 est plus fortement exprimé dans des tissus comme le thymus, alors

qu'on retrouvera en plus forte concentration Akt2 et Akt 3 dans le tissu adipeux et les testicules respectivement.

Toutes les isoformes d'Akt sont construites sur un modèle unique comprenant :

- Le domaine PH (*Pleckstrin homology domain*) N-terminal [398] d'Akt, confère une affinité pour les PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃ *in vitro* [399-401] et *in vivo* [402], lui permettant d'être recruté à la membrane lorsque la PI3K est active.
- Un domaine central sérine/thréonine kinase [403], qui reconnaît et phosphoryle spécifiquement des protéines contenant une séquence consensus de type RxRxxS/T-Hyd (x : résidu indifférent, Hyd : résidu hydrophobe (F ou L)) [404].
- Un domaine HM (*Hydrophobic Motif*) C-terminal important dans la régulation de l'activité kinase [405]. Le résidu D⁴⁶² représente un site de clivage potentiel d'Akt par les caspases. Cette dégradation a été observée en cas de déprivation en sérum [406]. Mais d'autres sites ont été décrits récemment, et notamment des sites de clivage par la caspase-3 [407].

5.2.2. Activation d'Akt

Akt nécessite la phosphorylation de 2 résidus, un dans le domaine catalytique, la T₃₀₈ et un dans le domaine HM, la S⁴⁷³. La phosphorylation d'Akt en T³⁰⁸ stimule l'activité enzymatique d'un facteur 100, et celle de S⁴⁷³ ajoute un facteur 10 [404]. Il existe deux kinases responsables de ces phosphorylations, la PDK1 (*Phosphoinositide-dependant kinase 1*), et la PDK2 (*Phosphoinositide-dependant kinase 2*).

- *La PDK1*

PDK1 a été identifiée à l'origine comme étant la kinase responsable de la phosphorylation du résidu T³⁰⁸ d'Akt1 [399, 408, 409]. C'est une protéine de 556 résidus exprimée de manière ubiquitaire. Elle possède un domaine sérine/thréonine kinase N-terminal et un domaine PH C-terminal [399].

- *La PDK2*

La phosphorylation du résidu S⁴⁷³ d'Akt induit un changement conformationnel qui stabilise le domaine kinase. La kinase responsable de cette phosphorylation reste mal définie à ce jour et est nommée PDK2 par rapport à PDK1. Plusieurs kinases ont été proposées, comme par exemple la PKC (*Protein kinase C*) [410], ou le complexe II de mTOR, (mTORC2 ou *mammalian target of rapamycin complex II*) [411, 412] mais aucun consensus ne ressort de ces études.

5.2.2.1. *Modèle d'activation d'Akt*

Le modèle classique d'activation d'Akt fait intervenir la production de PI(3,4,5)P₃ par les PI3Ks de type I en réponse à une stimulation. Cette production locale permet le recrutement d'Akt et de PDK1 à la membrane via leur domaine PH (figure 17). Il a été montré que le domaine PH est nécessaire à la phosphorylation d'Akt par PDK1 *in vitro*, en présence de PI(3,4,5)P₃ et PI(3,4)P₂ [401, 404, 413]. Comme pour PDK1, le domaine PH d'Akt ne joue pas simplement un rôle de recrutement au niveau des PIPs, il joue aussi un rôle inhibiteur de l'activité d'Akt au repos et sa liaison aux PIPs lève cette inhibition [414]. Une fois recrutée à la membrane, Akt va être phosphorylée sur sa T³⁰⁸ par PDK1 et sa S⁴⁷³ par PDK2. L'ordre dans lequel se font ces phosphorylation n'est pas clairement établi et certains montrent que la phosphorylation du résidu T³⁰⁸ précède celle du résidu S⁴⁷³, alors que d'autres postulent l'inverse. Cette question ne pourra être résolue qu'une fois, l'identité de(s) PDK2 définie.

5.2.3. *La régulation d'Akt*

Comme nous l'avons dit précédemment l'activation d'Akt nécessite la présence de PI(3,4,5)P₃ et PI(3,4)P₂. Ainsi la fonction d'Akt est contrôlée par l'activité des PI3Ks de type I et les PI-Phosphatases PTEN et SHIP (voir paragraphe 5.2.2). De plus l'activité d'Akt est liée à ses phosphorylations, ainsi la régulation de son activité fait intervenir des protéines phosphatases. Les déphosphorylations des sites T³⁰⁸ et S⁴⁷³ sont médiées par des phosphatases différentes. Ainsi, PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) et PP2C α , deux protéines phosphatases, sont

impliquées dans la déphosphorylation du résidu T³⁰⁸ d'Akt, mais pas dans celle de S⁴⁷³ [415-417]. Alors que PHLPP (*PH Leucine-rich repeat Protein Phosphatase*) semble être spécifique de S⁴⁷³ [418]. Il existe également des inhibiteurs chimiques d'Akt, pouvant agir de façon différente : comme par exemple les analogues des PI, qui sont des inhibiteurs compétitifs de la fixation d'Akt sur les PIPs, ou encore les inhibiteurs de la liaison à l'ATP qui inhibent l'activité kinase d'Akt. Au cours de notre étude, nous avons utilisé deux inhibiteurs d'Akt, l'un dépendant du domaine PH d'Akt, l'Akt inhibitor VIII, et l'autre indépendant du domaine PH, l'Akt inhibitor X.

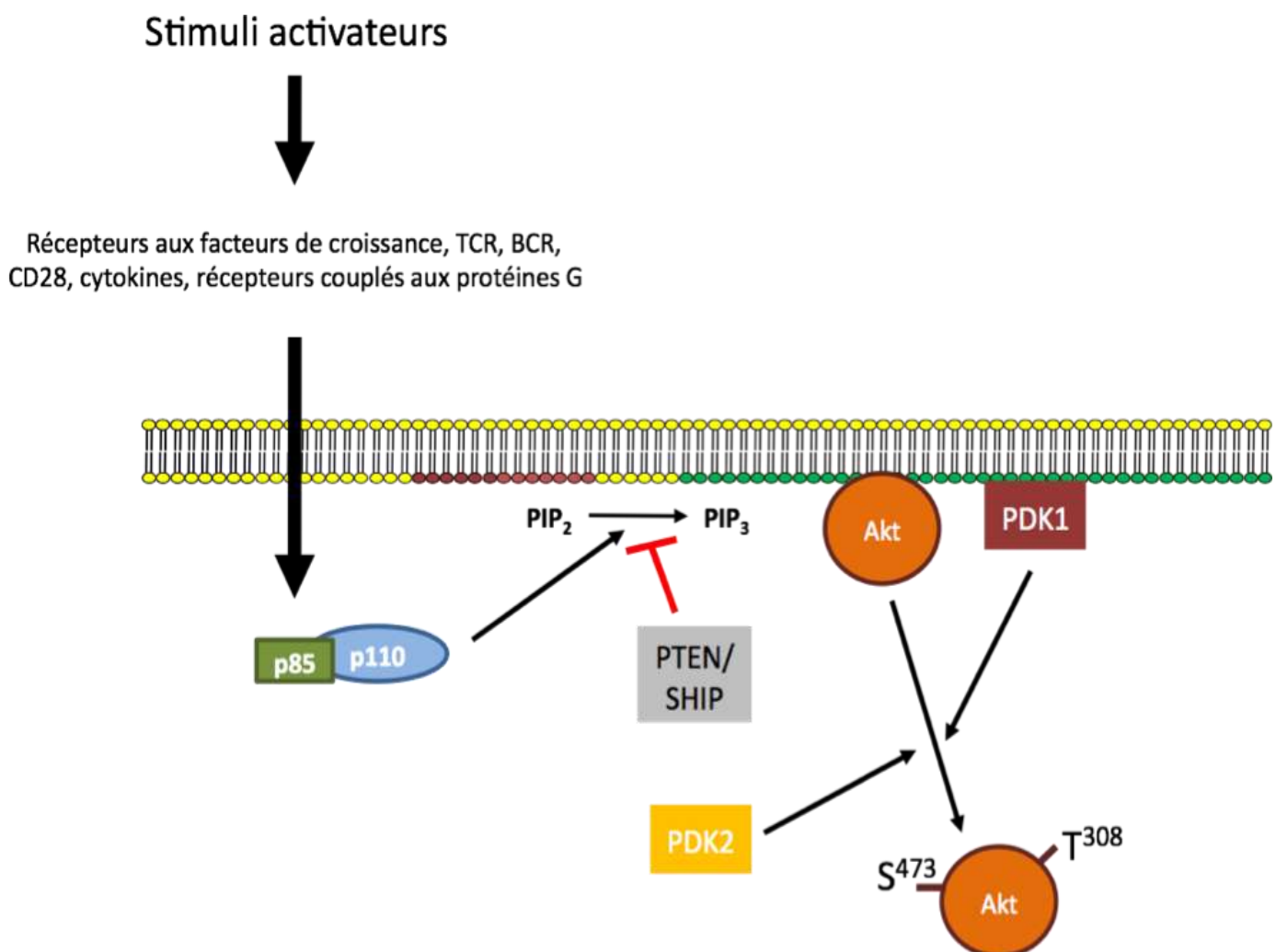


Figure 17 : Modèle d'activation de la voie PI3K/Akt

5.3. La voie PI3K/Akt et cancer

Parmi la famille des PI3Ks, un seul gène est impliqué dans des cancers, le gène *Pik3Ca* qui code pour la sous-unité p110 α de PI3K. *Pik3Ca* est muté dans près de 32% des cancers colorectaux [419], 27% des glioblastomes [420], 25% des cancers gastriques [421], 36% des cancers hépatocellulaires [422], 18 à 40% des cancers du sein [423, 424], 4 à 12% des carcinomes ovariens [425, 426] et 4% des cancers du poumon [419] [427]. Ces mutations entraînent une surexpression de p110 et/ou une augmentation de l'activité de la PI3K et d'Akt. Actuellement, on ne connaît pas de mutations d'Akt impliqués dans des cancers, mais sa sur-expression est fréquente. Ainsi, Akt2 est sur-exprimée dans près de 40% des cancers hépatocellulaires [428], 57% des cancers colorectaux [429], 32% des carcinomes pancréatiques et 57% des adénomes [429]. La surexpression d'Akt1 a été mise en évidence dans 24% des cancers du sein [430]. Enfin, à ce jour, la surexpression d'Akt3 n'a pas été corrélée avec le cancer. Le rapport entre l'expression des isoformes 1 et 2 d'Akt participe à la carcinogenèse puisqu'il a été impliqué dans la transition épithelio-mésenchymateuse [431].

Il existe également une grande variété de cancer où la voie de signalisation PI3K/Akt est amplifiée, via une mutation ou une délétion du gène *PTEN* [432], une inhibition de sa transcription [433], ou une instabilité de la protéine traduite [434]. En effet, une mutation de *PTEN* a été observée dans les glioblastomes, les carcinomes hépatocellulaires et les lymphomes [435-438]. L'inhibition de sa transcription est quant-à-elle retrouvée dans les mélanomes, les cancers de l'endomètre [439, 440], et une instabilité de la protéine PTEN dans les cancers du poumon [441].

5.4. La voie PI3K/Akt et le signal CD95

La voie PI3K/Akt est considérée comme anti-apoptotique et donc elle a été impliquée dans la modulation du signal CD95. Le rôle de protection de la PI3K dans l'apoptose CD95 [442, 443] est médiée par Akt. En effet, Akt est capable d'inhiber différentes étapes du signal CD95:

- *Régulation négative de protéines pro-apoptotiques*

Akt phosphoryle le résidu S¹³⁶ de Bad, qui permet sa séquestration dans le cytosol par des protéines 14-3-3, inhibant ainsi son activité anti-apoptotique [444, 445]. La caspase-9 est également phosphorylée sur sa sérine 196 par Akt, et cette phosphorylation bloque le clivage et donc l'activation de cette caspase [446].

- *Activation de protéines anti-apoptotiques*

Comme nous l'avons vu précédemment (voir paragraphe 3.5.1.3), l'activité anti-apoptotique de PED/PEA-15 est médiée par sa phosphorylation. La protéine Akt phosphoryle PED/PEA-15 sur le résidu S¹¹⁶ qui protège la protéine de la dégradation [447]. Akt protège également la protéine XIAP de sa dégradation, via une phosphorylation sur le résidu S⁸⁷ [448].

- *Régulation de facteurs de transcription*

La kinase Akt est capable d'inhiber des facteurs de transcription de la famille ForkHead ou FOXO, qui sont impliqués dans la transcription de gènes codant principalement pour des protéines pro-apoptotiques, tels que le CD95L, ou la protéine Bim [449]. A l'inverse, Akt active également des facteurs de transcription comme NF-κB, qui augmente l'expression de Bcl-2 et Bcl-XL [450, 451], de la protéine c-FLIP [452], ou encore l'expression d'IAPs [453].

A l'opposé, l'inhibition d'Akt entraîne l'expression de CD95L et une diminution de l'expression de c-FLIP qui favorise la mort du lymphocyte T [454]. Par ailleurs, les travaux de Varadhachary ont permis de corrélérer la résistance des lymphocytes T auxiliaires Th2 à

CD95 avec une augmentation de la production de PIP_3 , augmentation qui apparaît durant l'activation de ces cellules [455]. Ce groupe a ultérieurement décrit ce mécanisme, montrant que l'activation de la PI3K entraînait une inhibition de la formation du DISC et une diminution de la mobilité du récepteur dépendante de l'actine [456]. L'importance de l'axe de signalisation CD28-PI3K-Akt dans la régulation de l'apoptose CD95 a été confirmée *in vivo* dans un modèle de souris transgéniques, dans lequel l'activation de la PI3K conduisait à une inhibition de la formation du DISC [457].

Notre hypothèse est que la voie de signalisation PI3K/Akt prévient la localisation de CD95 dans les microdomaines, et ainsi inhibe les signaux proximaux du signal CD95, en amont de la formation du DISC.

Cette hypothèse sera testée dans les articles 1 et 2.

RESULTATS

Article 1

La voie phosphatidylinositol 3-kinase permet le maintien de CD95 en dehors des radeaux lipidiques

Article 1 : Localization of CD95/CD95 into the Lipid Rafts on Down-Modulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway

Marie Bénéteau¹, Mathieu Pizon¹, Benjamin Chaigne-Delalande, Sophie Daburon, Patrick Moreau, Francesca De Giorgi, François Ichas, Amélie Rebillard, Jean-François Moreau, Patrick Legembre.

¹ *M. Bénéteau and M. Pizon contributed equally to this work*

« Composantes Innées de la Réponse Immunitaire et Différenciation », CNRS UMR 5164, University of Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, Bordeaux 33076, France.

1) Introduction

Un agent anti-tumoral lipidique nommé édelfosine induit un signal apoptotique dépendant de la voie CD95 en redistribuant le récepteur dans les microdomaines [343, 344]. La voie PI3K étant inhibée par l'édelfosine [346], nous avons alors posé l'hypothèse que cette voie oncogénique inhibait la redistribution de CD95 dans les radeaux lipidiques.

2) Méthodologie générale

Au cours de cette étude nous avons utilisé des lignées lymphocytaires T humaines, comme la Jurkat, la CEM et la H9, une lignée lymphocytaire B, la SKW 6.4, une lignée promyélocytaire, la HL60, ainsi que des lymphocytes issus du sang périphérique (PBLs) de sujets sains. Les lignées H9 et SKW6.4 sont des lignées de type I et les lignées Jurkat et CEM sont des types II.

L'étude de l'activité de la PI3K a été réalisée de façon directe, en déterminant la quantité de PIP₃ dans les cellules, via un ELISA compétitif reconnaissant le PIP₃ (PIP₃ Mass ELISA kit), ou de façon indirecte, en étudiant la phosphorylation de la Ser⁴⁷³ d'Akt.

Nous avons mesuré la mort cellulaire de deux façons différentes : I) via un test de viabilité au MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), et II) via un test de fragmentation de l'ADN par marquage de cellules perméabilisées à l'iodure de propidium.

Afin de définir si le signal apoptotique induit lors de l'inhibition de la voie PI3K était dépendant de la voie CD95, nous avons utilisé plusieurs méthodes : I) l'utilisation de la lignée cellulaire CEM-IRC, qui est une lignée exprimant une faible quantité de CD95, et la lignée Jurkat Q257K dont la protéine CD95 est mutée sur son domaine de mort, ces deux lignées étant résistantes au signal CD95, II) la sur-expression d'un dominant négatif de la protéine FADD, le C-FADD, qui est une forme tronquée de FADD, et qui inhibe la formation du DISC.

L'implication des microdomaines a été étudiée via deux types de techniques : I) l'étude biochimique, en utilisant un chélateur du cholestérol, la M β CD (*methyl- β -cyclodextrin*), qui déstructure les microdomaines, ou en étudiant par western blot les protéines présentes ou exclues des radeaux lipidiques, isolés préalablement via une ultracentrifugation en gradient discontinu de saccharose, et II) l'étude microscopique, en marquant les microdomaines par la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB), elle-même couplée à l'Alexa Fluor 555. La CTB possède une affinité pour le GM1 lui-même enrichi dans les microdomaines.

ARTICLE 1

Localization of Fas/CD95 into the Lipid Rafts on Down-Modulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway

Marie Bénétou,^{1,2,3} Mathieu Pizon,^{1,2,3} Benjamin Chaigne-Delalande,^{1,2,3} Sophie Daburon,^{1,2,3} Patrick Moreau,⁴ Francesca De Giorgi,^{3,5} François Ichas,^{3,5} Amélie Rebillard,⁷ Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel,⁷ Jean-Luc Taupin,^{1,2,3,6} Jean-François Moreau,^{1,2,3,6} and Patrick Legembre^{1,2,3}

¹Université de Bordeaux 2; ²Centre National de la Recherche Scientifique-Unité Mixte de Recherche 5164; ³IFR66; ⁴Centre National de la Recherche Scientifique-Unité Mixte de Recherche 5200; ⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale E347, Institut Bergonié; ⁶Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Place Amélie Raba Léon, Bordeaux, France and ⁷Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale-Unité Mixte de Recherche 620, IFR 140, Université de Rennes 1, Rennes, France

Abstract

Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway is known to protect tumor cells from apoptosis and more specifically from the Fas-mediated apoptotic signal. The antitumoral agent edelfosine sensitizes leukemic cells to death by inducing the redistribution of the apoptotic receptor Fas into plasma membrane subdomains called lipid rafts. Herein, we show that inhibition of the PI3K signal by edelfosine triggers a Fas-mediated apoptotic signal independently of the Fas/FasL interaction. Furthermore, similarly to edelfosine, blockade of the PI3K activity, using specific inhibitors LY294002 and wortmannin, leads to the clustering of Fas whose supramolecular complex is colocalized within the lipid rafts. These findings indicate that the antitumoral agent edelfosine down-modulates the PI3K signal to sensitize tumor cells to death through the redistribution of Fas into large platform of membrane rafts. (Mol Cancer Res 2008;6(4):604–13)

Introduction

Fas (CD95/APO-1) belongs to the tumor necrosis factor receptor family and triggers an apoptotic signal, playing a

pivotal role in the homeostasis of the immune system (1). Dysfunction of the Fas pathway leads to autoimmune diseases and lymphoma progression (2, 3). Fas contains an intracellular domain, termed death domain, which serves as a docking platform initiating the apoptotic signal. On binding to its cognate ligand, FasL, Fas recruits the adaptor molecule Fas-associating protein with death domain (FADD), which in turn aggregates the initiator caspase-8 and caspase-10. FADD carries a death domain and a death effector domain, which are essential to bind via homotypic interactions the receptor Fas and the proteases caspase-8 and caspase-10, respectively. This molecular complex (Fas/FADD/caspases) is termed death-inducing signaling complex (DISC; ref. 4). The concentration of these caspases in a condensed area allows their activation and the release in the cytoplasm of activated caspase-8 and caspase-10, thereby leading to the triggering of the apoptotic signal. According to the DISC formation, cells have been classified in two types: in type I cells, Fas engagement leads to the efficient formation of the DISC and a large amount of active caspases is released in the cytoplasm, and in contrast, in type II cells, DISC formation and caspase release are impaired (5).

Owing to the importance of Fas in homeostasis, this proapoptotic cascade is under the tight control of several factors, among which is the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway. This signal is found constitutively activated in different solid tumors or leukemia cells and is involved in cell transformation as well as in tumor relapse after treatment with anticancer drugs (6). The function of class I PI3Ks is to convert phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) to phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3) at the inner leaflet of the plasma membrane (see ref. 7 for review). The PIP3 production is tightly controlled and its amount is counterbalanced by the action of several PIP3 phosphatases (PTEN, SHIP1, and SHIP2). An increased production of PIP3 leads to the binding of intracellular enzymes containing pleckstrin homology domains, such as the kinase Akt (protein kinase B). Once Akt is recruited to the inner leaflet of the plasma membrane, this serine-threonine kinase undergoes activation through its phosphorylation on Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³. Activated Akt phosphorylates a variety of substrates involved in pleiotropic cell functions, such as proliferation,

Received 7/16/07; revised 11/30/07; accepted 12/28/07.

Grant support: Agence Nationale de la Recherche grant JC07_183182, Association pour la Recherche sur le Cancer grant 3798, La Fondation de France (Leucémie), and La Ligue Contre le Cancer (Comité de la Dordogne). P. Legembre is an employee of the French Institute of Health and Medical Research (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale). M. Bénétou was supported by a grant from the French Ministry of Education, Research and Technology.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Note: Supplementary data for this article are available at Molecular Cancer Research Online (<http://mcr.aacrjournals.org>).

M. Bénétou and M. Pizon contributed equally to this work.

Requests for reprints: Patrick Legembre, Centre National de la Recherche Scientifique-Unité Mixte de Recherche 5164, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France. Phone: 33-5-57-57-11-24; Fax: 33-5-57-57-14-72. E-mail: plège@u-bordeaux2.fr

Copyright © 2008 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0331

survival, glucose metabolism, and cytoskeletal changes (8). In T lymphocytes, activation of PI3K on CD3/CD28 cotriggering protects cells from a premature elimination by Fas-mediated cell death (9). This PI3K-mediated protection is achieved through induction of antiapoptotic genes, among which are *Bcl-2* or *c-FLIP* (10, 11), through inhibition of the Bcl-2 antagonist of cell death apoptotic function (12), and through abrogation of the DISC formation by a yet unknown mechanism (9).

The classic fluid mosaic model of the cell membrane introduced by Singer and Nicolson in 1972 (13) has been extended in the last decade with the lipid raft theory (14, 15). Indeed, the extracellular leaflet is now depicted as a heterogeneous structure containing compacted proteolipidic assemblies (ordered phase) that float into the rest of a more fluid membrane (liquid phase). These subdomains are enriched in sphingolipids and cholesterol and they are resistant to cold lysis using nonionic detergents. These subdomains are currently designated as detergent-resistant microdomains, glycosphingolipid-enriched microdomains, lipid rafts, membrane rafts, or simply microdomains. We and others have reported that the Fas-mediated apoptotic signal is augmented when Fas is redistributed into these domains of the plasma membrane (16–18). Moreover, the canonical Fas-mediated apoptotic signal can be activated independently of the Fas/FasL interaction via the sole redistribution of Fas into the lipid rafts (18, 19). The ether lipid 1-*O*-octadecyl-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (Et-18-OCH₃ or edelfosine) belongs to a novel class of promising antitumor agents (20, 21). When added to cell cultures, this lipid incorporates into the membrane of leukemic cell lines and induces the redistribution of Fas into the lipid rafts and the elimination of the tumor cell through a Fas-dependent but FasL-independent apoptotic signal (19). However, to date, the molecular mechanisms triggered by edelfosine and involved in the mobilization of Fas into lipid rafts remain unknown (22).

Because (a) the PI3K signaling pathway has been involved in controlling the lateral mobility of Fas in the plasma

membrane (23) and (b) this antiapoptotic signal is well known to prevent the Fas-mediated apoptotic signal, we investigated whether inhibition of the PI3K activity could account for the redistribution of Fas into the lipid rafts observed on the edelfosine treatment (22).

Results

Edelfosine Modifies the Membrane Distribution of Fas and Is an Inhibitor of the PI3K Signaling Pathway

To confirm that the Fas signal is necessary for the edelfosine-mediated cell death signal, we tested the sensitivity of a Fas mutant-expressing Jurkat cell line on edelfosine treatment. We previously showed that hemizygous expression of a death domain-mutated Fas (FasQ257K) does not prevent the Fas-mediated apoptotic signal triggered on FasL incubation but significantly reduces it (24). Similarly, addition of edelfosine to the culture treatment killed less efficiently the FasQ257K-expressing Jurkat cell line than the parental cell (Fig. 1A).

Because it has been reported that edelfosine induces the Fas signal through the redistribution of Fas inside the detergent-resistant microdomains (19), we next determined whether the disruption of the lipid rafts was able to abrogate the edelfosine-induced apoptotic signal. Integrity of the lipid rafts depends on the concentration of cholesterol into the plasma membrane (15, 25), and preincubation of Jurkat cells with the methyl- β -cyclodextrin (M β CD), a chelator of cholesterol, dismantles these lipid rafts (26). Lipid rafts are considered resistant to cold lysis by nonionic detergent, and due to their lipid composition, they exhibit a lower density than the rest of the membrane. Owing to these properties, lipid rafts can be separated from the rest of the membrane after ultracentrifugation of a cell lysate into a discontinuous sucrose gradient (see Materials and Methods). We previously found that, in the T leukemia cell line Jurkat, the transmembrane protein CD28 is enriched into the microdomains (17); therefore, to confirm that M β CD treatment efficiently disrupts lipid rafts, we followed the submembrane localization of CD28 in Jurkat cells treated with

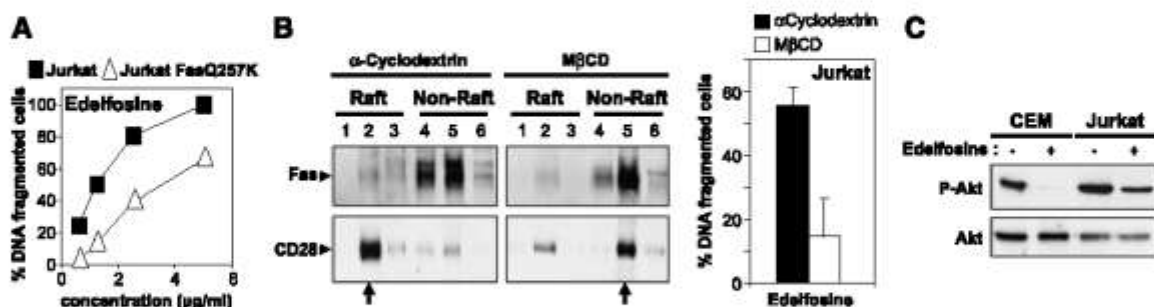


FIGURE 1. Edelfosine-mediated cell death. Apoptosis was quantified by propidium iodide staining and results were expressed as percentage of cells in the sub-G₁ phase. **A.** Parent and FasQ257K Jurkat cells were untreated or treated for 20 h with edelfosine before the sub-G₁ population was quantified using flow cytometry. **B.** Jurkat (10⁶ cells per condition) was treated with 5 mmol/L of M β CD or α -cyclodextrin (control), lysed, and subjected to a sucrose gradient ultracentrifugation. For each fraction harvested (six fractions), 10 μ g of proteins were loaded in a 12% SDS-PAGE and the presence of Fas and CD28 was detected by immunoblot using specific antibodies. Arrows, redistribution of CD28 from the lightest "raft" fractions to the "nonraft" fractions on M β CD treatment. Jurkat cells were pretreated with 5 mmol/L of M β CD or α -cyclodextrin (control) for 30 min, washed, and incubated for 8 h in serum-free medium in the presence of 5 μ g/mL edelfosine. Columns, mean of three experiments; bars, SD. **C.** CEM and Jurkat cell lines were incubated for 2 h with 5 μ g/mL edelfosine and phospho-Akt (P-Akt; top) and total Akt (bottom) was detected by immunoblotting. The data are representative of at least three independent experiments.

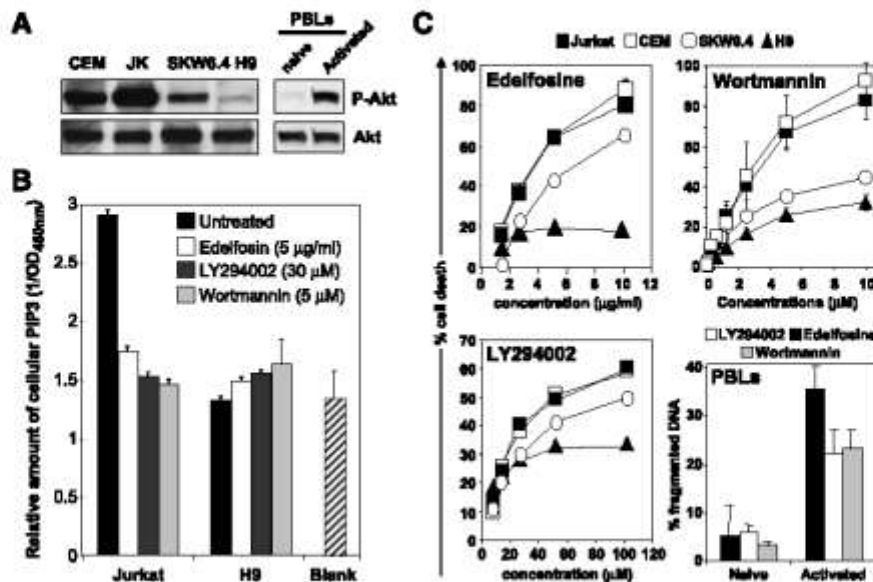


FIGURE 2. Edelfosine-induced cell death is preferentially transmitted in cells harboring a strong Akt activation. **A.** The T leukemia cell lines H9, CEM, and Jurkat or the B leukemia cell line SKW6.4 were lysed and the cellular Akt activity was determined by immunoblot using a phospho-Akt and a whole Akt protein antibodies. PBLs were harvested and activated as described in Materials and Methods. **B.** Using a competitive PIP3 ELISA (see Materials and Methods), we determined the amount of PIP3 in cells untreated or treated for 4 h with the indicated doses of PI3K inhibitors and edelfosine. Because the PIP3 ELISA is a competitive ELISA, the relative amount of PIP3 isolated from each cell was calculated using 1/absorbance at 450 nm (1/OD_{450nm}). A solution devoid of PIP3 was used to determine the blank. Columns, average of three independent experiments; bars, SD. **C.** The sensitivity of the indicated cells toward the PI3K inhibitors or the edelfosine incubation was assessed using a MTT assay. Cells were incubated for 16 h with the indicated agents. Columns, mean of three independent experiments; bars, SD.

the cholesterol chelator or with its nonactive counterpart (α -cyclodextrin; ref. 17). In α -cyclodextrin-treated cells, CD28 was concentrated into lipid rafts, whereas after treatment with a nontoxic dose of M β CD, CD28 was found enriched in the nonlipid raft membranes corresponding to the fractions harvested in the bottom of the ultracentrifuge tube (Fig. 1B). As it can be observed in Fig. 1B, a faint amount of Fas was localized into the lipid rafts (Fig. 1B) and the M β CD treatment slightly decreased the quantity of Fas present in these microdomains (Fig. 1B). We previously showed that, due to the weak amount of Fas distributed into the lipid rafts in the Jurkat cell line, the Fas-mediated apoptotic signal remained unchanged once lipid rafts are disturbed (data not shown; refs. 17, 27). On the other hand, the dismantling of detergent-resistant microdomains via the M β CD treatment efficiently prevented edelfosine-mediated apoptotic signal (Fig. 1B). These findings supported that the antitumoral effect mediated by edelfosine mainly relied on the redistribution of Fas into the lipid rafts (19).

Recently, edelfosine has been described as an inhibitor of the PI3K signal in different carcinoma cell lines through a still unknown mechanism (28). We analyzed whether edelfosine was also able to impair the PI3K activity in different leukemic cell lines. Untreated CEM and Jurkat cells constitutively exhibited an important level of Akt phosphorylation (Fig. 1C), which is a well known consequence of the PIP2 and PIP3 lipid generation by active PI3K. As observed in Fig. 1C, edelfosine dramatically decreased the amount of cellular

phospho-Akt, whereas the amount of the whole protein remained unchanged (Fig. 1C). Taken together, these results indicate that edelfosine down-modulates the PI3K activity in leukemic cells, whereas its cytotoxic activity requires Fas and lipid raft integrities.

Edelfosine, Similarly to PI3K Inhibitors, Selectively Induces Cell Death in Cells Expressing High PI3K Activity

To study whether the apoptotic signal triggered by edelfosine effectively relies on PI3K inhibition, we graded various T and B leukemia cells according to their level of basal Akt activation. Three groups of cells were selected: one displaying a strong PI3K activation (T leukemia cells CEM, Jurkat, and activated T lymphocytes), one displaying an intermediate PI3K activation (B lymphoma cell line SKW6.4), and, finally, one displaying a weak PI3K activation (T leukemia cell line H9 and naive T lymphocytes; see Fig. 2A). Freshly isolated peripheral blood lymphocytes (PBL) did not harbor any phosphorylation of the kinase Akt, whereas in activated PBLs Akt is strongly phosphorylated and activated (Fig. 2A). Similarly to edelfosine, commercially available PI3K inhibitors, wortmannin and LY294002, efficiently abrogated the activation of the kinase Akt (Supplementary Fig. S1). It is noteworthy that the leukemic T-cell line Jurkat is deficient in protein expression of the lipid phosphatases Src homology 2 domain containing inositol polyphosphate phosphatase (SHIP) and the phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN), which normally counterbalance the

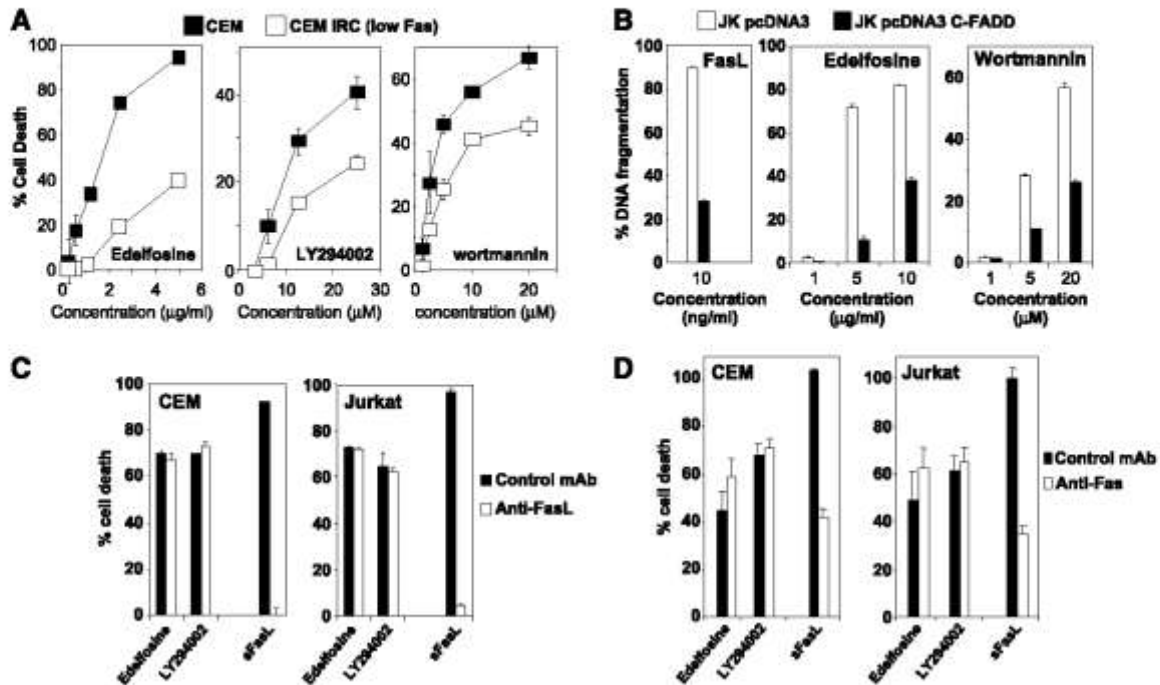


FIGURE 3. Edelfosine or PI3K inhibitors induce a Fas-mediated apoptotic signal independent of the Fas/FasL interaction. **A.** CEM (■) and CEM-IRC (□) were incubated 20 h with specific PI3K inhibitors or edelfosine and cell death was quantified using MTT assay. **B.** Stable Jurkat cells expressing empty vector or C-FADD were incubated for 20 h with the indicated agent and cell death was measured using a propidium iodide assay. **C.** CEM and Jurkat cells were preincubated for 30 min with 10 μg/mL of anti-FasL blocking antibody (clone 10F2) or isotype-matched control and treated with edelfosine (5 μg/mL), LY294002 (50 μmol/L), wortmannin (10 μmol/L), or soluble FasL (sFasL; 1 μg/mL) for 16 h. Viability was measured using a MTT assay. **D.** Cells were preincubated with 10 μg/mL of a blocking anti-Fas antibody (clone ZB4) or isotype-matched control and then treated as described above. Viability was measured using a MTT assay. In all four panels, data depict mean ± SD of three independent experiments.

PI3K-mediated *de novo* generation of PIP3 and hence the level of Akt phosphorylation (29). Thus, in the Jurkat cell line, the significant decrease of the Akt phosphorylation observed following edelfosine addition to cell culture could be associated to a direct down-modulation of the PI3K activity or to the abrogation of the PIP3 docking action.

The leukemic T-cell line Jurkat is devoid of SHIP and PTEN expressions (12), implying that in this cell line any modification of the PIP3 level will be associated to a direct effect on the PI3K activity. Because H9 cell line did not exhibit any activation of Akt (Fig. 2A), the cell was used to identify the baseline level of PIP3 present in a cell line. To show that edelfosine impaired the PI3K activity and so abrogated the production of PIP3, the cellular content of PIP3 was quantified using a PIP3-competitive ELISA. We confirmed that the amount of PIP3 in the H9 cell line was trivial because it was identical to the blank level (Fig. 2B). On the other hand, a high quantity of PIP3 was measured in the Jurkat cell line (Fig. 2B). Although edelfosine and the selective PI3K inhibitors LY294002 and wortmannin do not alter the PIP3 amount quantified in the H9 cell line, all these agents dramatically decreased the total amount of PIP3 in the Jurkat cell line to bring it down to the blank level (no PIP3).

Taken together, these findings strongly support the conclusion that edelfosine acts directly as a potent inhibitor of the

PI3K activity, but to date, the molecular mechanism involved in this inhibition remains unknown.

Edelfosine, which was very efficient at killing CEM and Jurkat cells, was ineffective at eliminating both H9 cell line and naive PBLs (Fig. 2C). The SKW6.4 cell line possessed an intermediate sensitivity to this drug (Fig. 2C). To determine whether the inhibition of the PI3K signal behaves as edelfosine on these cell lines, we tested LY294002 and wortmannin on the different cell lines and T lymphocytes. Strikingly, these PI3K inhibitors displayed a similar apoptotic effect on the different cell lines and PBLs compared with edelfosine treatment. Indeed, edelfosine and the PI3K inhibitors exerted a trivial effect on cells harboring a weak PI3K activity (naive T lymphocytes or the H9 cell line), whereas, in contrast, cell death was efficiently transmitted in cells expressing a potent PI3K activity. Because we noticed a strong correlation between the activation status of the kinase Akt and the effect of edelfosine, we suggest that edelfosine mediates its Fas-dependent apoptotic signal (Fig. 1A; refs. 19, 22) through inhibition of the PI3K signal.

Inhibition of the PI3K Activity Triggers a Fas-Mediated Cell Death Independently of Fas/FasL Interaction

To formally prove that, similarly to edelfosine, PI3K inhibition induces a Fas-mediated apoptotic signal, we generated two cell lines carrying a defect in the Fas signaling

pathway. The Fas-deficient CEM cell line (CEM-IRC) has been obtained by a prolonged culture in the presence of a saturating concentration of soluble multimeric FasL. This cell line, which expressed a reduced amount of membrane Fas compared with the parental CEM, proved to be resistant to Fas-mediated cell death (Supplementary Fig. S2A). As well, the CEM-IRC was also resistant to the apoptotic signal triggered by incubation with the PI3K inhibitors and edelfosine (Fig. 3A). Expression of a truncated FADD molecule devoid of its death effector domain (C-FADD) has been shown to alter the DISC formation and to impair the Fas signaling pathway (30). Therefore, to show that the Fas signaling pathway was instrumental for the apoptosis mediated by PI3K inhibition, we generated a Jurkat cell line that stably overexpressed C-FADD. As can be seen in Fig. 3B, this cell line was resistant to both the Fas-mediated cell death and edelfosine or PI3K inhibitor treatments compared with the parental cell line (Fig. 3B). These data support that induction of apoptosis following PI3K inhibition requires an intact Fas signaling pathway.

Some antitumoral drugs have been described to eliminate tumor cells by triggering a Fas-dependent apoptotic signal via two distinct mechanisms. Whereas anticancer drugs such as doxorubicin and bleomycin promote *de novo* FasL expression and kill Fas-expressing tumor cells via suicide or fratricide (31, 32), edelfosine and cisplatin lead to the redistribution of Fas into the lipid rafts, which in turn allows the induction of the Fas pathway independently of the presence of its ligand (22, 33). In the first situation, the apoptotic signal can be abrogated by pretreating the cells with blocking anti-Fas or anti-FasL antibodies (31, 32), whereas in the second antibodies are inefficient to prevent the Fas-mediated apoptotic signal. To distinguish between these two possibilities, we tested the efficiency of Fas or FasL blocking antibodies to inhibit cell death triggered on treatment with the different PI3K inhibitors. Although the blocking monoclonal antibodies (mAb) targeting Fas (clone ZB4) or FasL (clone 10F2) dramatically blocked the apoptotic signal induced by FasL in CEM or Jurkat, they did not influence cell death triggered by the PI3K inhibitors

(Fig. 3C and D). Next, the expression of FasL was analyzed at the cell surface (flow cytometry) and in the whole cell (immunoblot on total lysates) after incubation with the different inhibitors of PI3K. CEM and Jurkat cells do not express any detectable amount of FasL (Supplementary Fig. S3). These results clearly showed that inhibition of the PI3K signal induces an apoptotic signal, which relies on the Fas pathway but is independent of the interaction of Fas with its natural ligand, FasL. Taken together, these findings suggested that the Fas-dependent apoptotic signal observed on PI3K inhibition may be dependent on the redistribution of the death receptor into the lipid rafts.

Inhibition of the PI3K Signaling Pathway Leads to the Redistribution of Fas into Low-Density Lipid Rafts

Because edelfosine triggers the membrane capping of Fas and its redistribution into lipid rafts by a still unknown mechanism (19, 22, 34), we investigated whether the PI3K inhibition could lead to the redistribution of Fas into the lipid rafts.

Lipid rafts were isolated from cells with high (Jurkat and CEM) or low (H9) PI3K activity using a discontinuous sucrose gradient ultracentrifugation. Fractions were harvested from the top to the bottom of the gradient tube and Fas was detected by Western blotting (Fig. 4A). As CD28, the lipid raft marker used in the Jurkat cell line, was not detected at the plasma membrane of the CEM, we decided to use another marker of the lipid rafts, the tyrosine kinase p56^{Lck}. This src kinase was found concentrated almost exclusively in the fractions 1 to 3 of the gradient. Strikingly, a significant amount of Fas was present in the lipid raft fractions of the H9 cell line (PI3K activity impaired), whereas it was barely detectable into the lipid raft fractions of the two leukemia cells CEM and Jurkat, which exhibit a strong Akt activation (Fig. 4A). To prove that PI3K activity controls the lipid environment of Fas in the cell membrane and that inhibition of this signaling pathway contributes to the redistribution of the apoptotic receptor into the lipid rafts, we incubated Jurkat and CEM cell lines with LY294002 or wortmannin and subsequently analyzed the

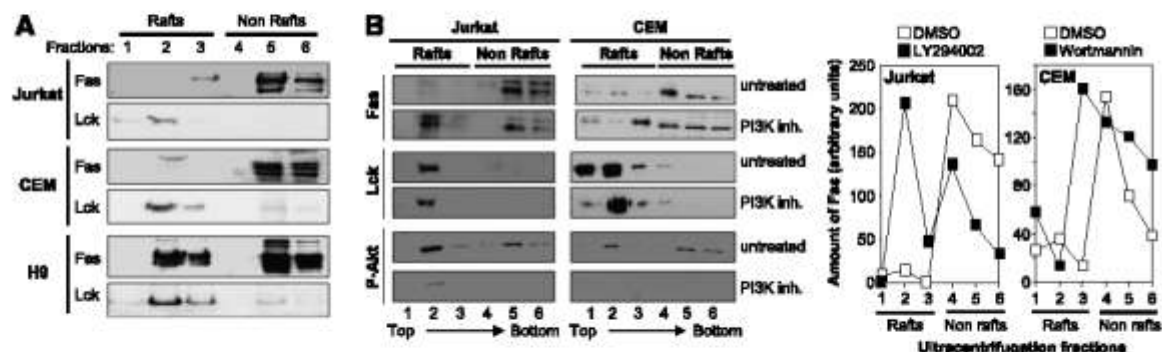
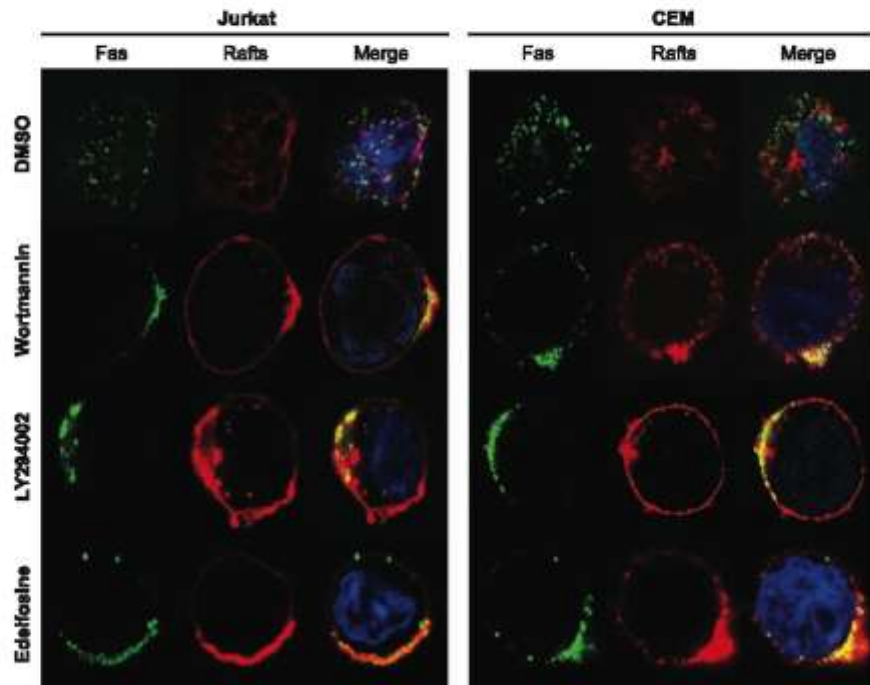


FIGURE 4. Inhibition of the PI3K signaling pathway induces the redistribution of Fas into the low-density microdomains. **A.** Lipid rafts were isolated using the sucrose gradient fractionation method as described in Materials and Methods. For each harvested fraction, 10 μ g of proteins were loaded in a 12% SDS-PAGE. Lck (lipid raft marker) and Fas distribution were analyzed by immunoblotting. **B.** Jurkat or CEM cell lines (10^5 per condition) were treated or untreated for 4 h with LY294002 (20 μ M/L) or wortmannin (5 μ M/L), respectively, lysed, and subjected to a sucrose gradient ultracentrifugation. For each fraction harvested (six fractions), 10 μ g of proteins were loaded in SDS-PAGE and the presence of Fas, Lck, and phospho-Akt was analyzed by immunoblot using specific antibodies. A densitometric analysis of the Fas amount present in each fraction was done using ImageJ software (W.S. Rasband, NIH, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

FIGURE 5. Capping of Fas is induced on PI3K inhibition and colocalizes with membrane lipid rafts. Jurkat and CEM cell lines were incubated for 4 h with LY294002 (20 μ M), wortmannin (5 μ M), and edelfosine (5 μ M) or left untreated. Green, Fas localization was followed using an anti-Fas mAb and a secondary Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse secondary antibody; red, microdomains were stained using Alexa Fluor 555-labeled cholera toxin subunit B; yellow, membrane area where Fas and lipid rafts were merged; blue, nuclei were stained using 4',6-diamidino-2-phenylindole.



distribution pattern of Fas within the ultracentrifugation gradient. LY294002 or wortmannin treatment efficiently inhibited the PI3K activity because the phosphorylated form of Akt disappeared (Fig. 4B, *bottom*). Concomitantly to the inhibition of the PI3K activity, we observed that a significant amount of Fas was redistributed into the lipid raft-containing fractions in type II cell lines Jurkat and CEM (Fig. 4B, *top*). The enrichment of Fas into the lipid rafts was accurately quantified using ImageJ software (35) by scan analysis of the Fas bands (Fig. 4B). In conclusion, using a biochemical method for analyzing lipid rafts, we showed that the intracellular PI3K signal is mandatory to exclude Fas from the lipid rafts, whereas its down-modulation led to the enrichment of Fas into the microdomains.

To further confirm that Fas and lipid rafts colocalize on PI3K inhibition, we followed the plasma membrane distribution of Fas using confocal microscopy. PI3K inhibition potentially triggered the clustering of Fas, which was estimated to reach a size around the micrometer range (green staining, Fig. 5). To determine whether these clusters of Fas were merged with the sphingolipid-enriched microdomains, we simultaneously stained Fas (green staining) and lipid rafts using the Alexa Fluor 555-labeled cholera toxin subunit B (red). This toxin is currently used to stain the lipid rafts because it possesses a high affinity for the monosialoganglioside GM1, which is concentrated into the microdomains (36). Confirming the results obtained using the sucrose gradient ultracentrifugation method, the untreated CEM and Jurkat cell lines did not exhibit colocalization of Fas with lipid rafts as visualized by confocal microscopy analysis (condition DMSO in Fig. 5). In contrast, PI3K inhibitors induced the formation of Fas clusters, which

were colocalized with the cholera toxin B-FITC staining (Fig. 5). It is noteworthy that although the distribution of Fas into the lipid rafts was almost exclusive, an important part of the microdomains did not contain Fas. It is conceivable that, based on their molecular content, lipid rafts are not a uniform and homogenous pool constituted of identical domains but rather, as we previously showed, different types of lipid rafts may coexist and are consequently able to transmit distinct signals (27). Accordingly, we propose that, on PI3K inhibition, Fas is efficiently capped, whereas only a part of the cholesterol-enriched domains are mobilized.

To generalize the data obtained with the CEM cell line, we examined the status of the acute promyelocytic leukemia cell line HL-60, which displays a high PI3K activity (data not shown) and has been previously used extensively to characterize the redistribution of Fas into the lipid rafts on edelfosine treatment (19). Similarly to Jurkat and CEM cell lines, HL-60 cell line is highly sensitive to the inhibition of the PI3K signaling pathway (Fig. 6A, *left*). As depicted in Fig. 6A (*right*), the inhibitors of PI3K significantly increased the number of cells harboring Fas clusters colocalized with lipid rafts. Using confocal microscopy, we observed that Fas was excluded from the lipid rafts (Fig. 6B, *top*) in the untreated cells, whereas it was clustered and redistributed into these microdomains on PI3K inhibition or edelfosine treatment. To qualitatively show that Fas (green) and lipid rafts (red) were merged, a line was drawn around the cell perimeter (plasma membrane), and this region of interest was separately analyzed to the exclusion of the rest of the image for the intensity of each fluorescence (green and red; see Fig. 6B, *right and bottom*). Scan analysis of the cell perimeter clearly showed that the

intensity of green and red fluorochromes was accurately superimposed and, as a consequence, confirmed that the PI3K inhibition induced the redistribution of Fas inside a lipid environment enriched in GM1, the lipid rafts.

Discussion

Herein, we show that inhibition of the PI3K signaling pathway triggers the rapid formation of Fas cluster and the redistribution of Fas into the so-called lipid rafts. We also bring new evidences that the promising antitumoral agent edelfosine efficiently down-modulates the PI3K signal in T leukemia cell lines and in activated T lymphocytes, leading to (a) the induction of a Fas-mediated apoptotic signal and (b) the formation of micrometer range clusters of Fas. To our knowledge, this study is the first to link a molecular target of

edelfosine to the previously well-described redistribution of Fas into the lipid rafts, leading to the elimination of leukemia cells (22, 34, 37). The class I PI3Ks are found constitutively activated in numerous leukemia cell lines and in cells isolated from various types of leukemia-suffering patients (38). The inhibition of the PI3K pathway promotes apoptosis in leukemia cells or activated PBLs and promotes the capping of Fas and its redistribution into the lipid rafts, which are essential processes in the efficient progression of the Fas-mediated apoptotic signal (16-18, 39).

As the T leukemic cell line Jurkat expresses neither the phosphatase SHIP nor the phosphatase PTEN, which normally counterbalances the PI3K-mediated *de novo* generation of PIP3 and hence the level of Akt phosphorylation (29), the significant decrease of the Akt phosphorylation observed following edelfosine treatment can reasonably be assigned to its sole

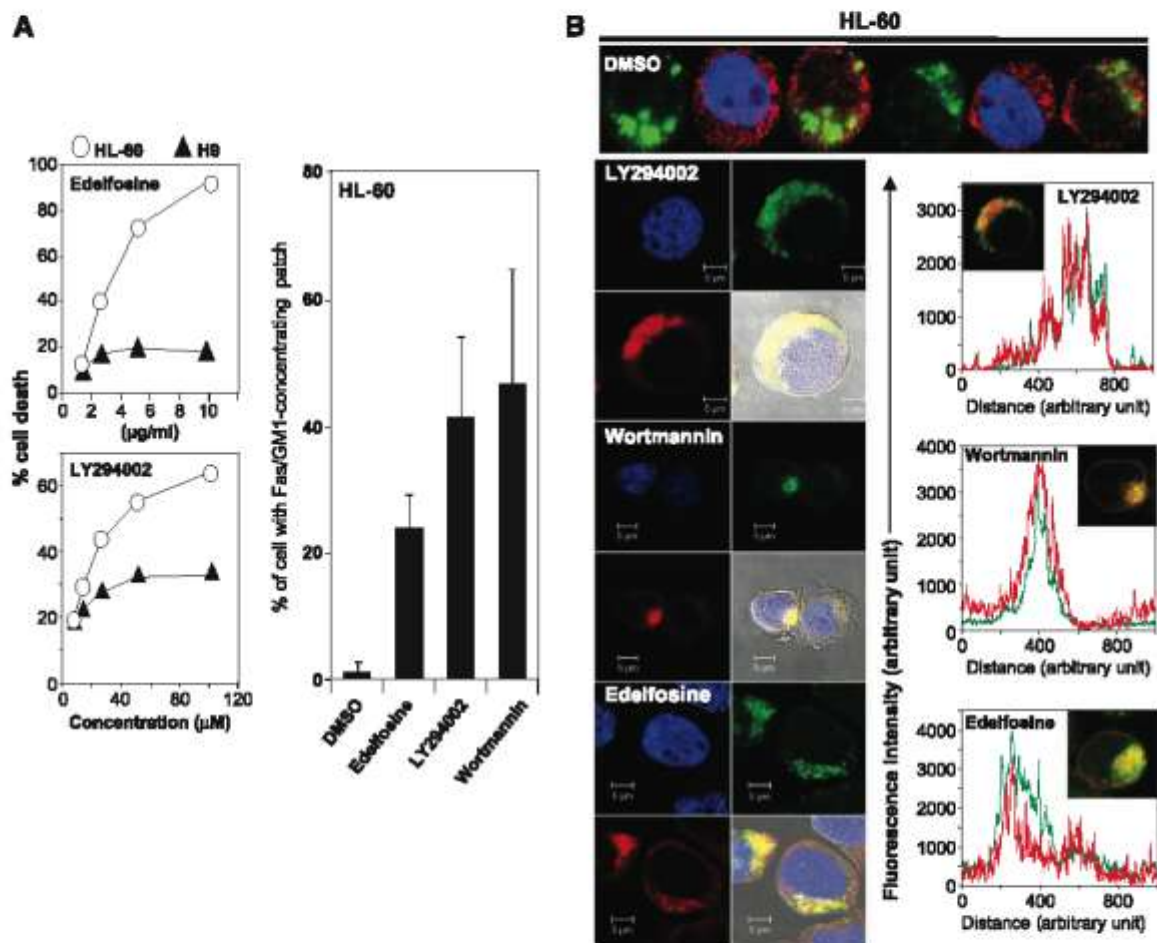


FIGURE 6. Fas and lipid rafts colocalize on PI3K inhibition. **A.** Left, H9 (▲) and HL-60 (○) cell lines were incubated for 20 h with edelfosine or LY294002 and viability was measured with a MTT assay. The HL-60 cell line was incubated for 2 h with the indicated agents. Cells were adhered on a poly-L-lysine slide, and then Fas and microdomains were stained. The percentage of cells exhibiting a clustering of Fas colocalizing with the lipid raft staining was quantified. At least 500 cells were counted for each condition. **B.** HL-60 cells were incubated with the indicated agents for 2 h, stained, and analyzed using confocal microscopy. Red and green fluorescence intensities at the plasma membrane were quantified around the perimeter of the cells and plotted in the corresponding graphs. X axis, distance around the periphery of the cell; Y axis, relative fluorescence intensity of the pixels.

inhibition of the PI3K. Moreover, recently, it has been reported that fluorescent analogue of edelfosine incorporates selectively into the plasma cell bilayer of leukemia cells and activated T lymphocytes, whereas it does not stain naive T cells (19). To date, we could envisage that (a) by virtue of its lipid nature edelfosine acts directly on the PI3K to down-modulate its activity or (b) its incorporation into the plasma membrane bilayer impinges on the PI3K substrate, PIP3, modifying its docking activity and thus preventing the downstream recruitment of Akt. The accurate characterization of edelfosine molecular target(s) will be essential as it would help to define new therapeutic agents and to understand the molecular ordering responsible for the Fas redistribution into the lipid rafts.

Herein, we showed that cell death following PI3K inhibition needs the integrity of the Fas signaling pathway. However, the overexpression of the dominant-negative mutant FADD, which impairs the formation of the DISC, was more efficient to prevent cell death triggered on PI3K abrogation than is the expression of a dominant-negative Fas mutant (FasQ257K) or the down-expression of membrane Fas (CEM-IRC). It is well established that, similarly to Fas, the tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand receptors death receptors 4 and 5 (DR4 and DR5) require the adaptor molecule FADD to transmit their apoptotic signal (40, 41), and a recent publication reported that DR4 and DR5 were also involved in the induction of the edelfosine-mediated apoptotic signal (37). Therefore, it is conceivable that, on PI3K inhibition, tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand receptors DR4 and DR5 may partially alleviate the default in cell death induction due to the down-expression of Fas or the hemizygous expression of a mutated Fas, whereas on the other hand the apoptotic signal is more dramatically abrogated when a dominant-negative FADD, which inhibits all the death receptor signals, is overexpressed. These findings imply that plasma membrane distribution of DR4 and DR5 on PI3K inhibition should also be studied in the future.

Formation of the supramolecular complexes of Fas has been previously observed as well as on soluble, membrane-bound FasL or agonistic anti-Fas stimulations, and these structures are essential for the transmission of the apoptotic signal (39, 42). All these extracellular ligands of Fas are well described to favor Fas capping and induction of cell death, whereas, herein, we point out that an intracellular stimuli (PI3K activation) is also able to control the aggregation level of the transmembrane receptor Fas.

The activated PI3K signaling pathway prevents the formation of large and oriented Fas-containing detergent-resistant microdomains reminiscent of what happens within the "immune synapse" observed on T lymphocyte activation (36). The formation of this synapse has been extensively studied and cumulative data favor the involvement of the actin cytoskeleton and actin-linked adaptors belonging to the ezrin/moesin/radixin family to the formation of this lipid raft enriched supramolecular complex (43). Ezrin has been reported as essential to induce the Fas-mediated apoptotic signal (44) and to interact directly to the regulatory subunit p85 of the PI3K (45). Furthermore, recent works by Stickney et al. (46) showed that merlin, a protein related to the ezrin/moesin/radixin family,

was able to link the actin cytoskeleton to the lipid rafts. Members of this family of membrane/filamentous actin linkers are therefore likely to play a role in the redistribution of Fas inside the lipid rafts under the control of the PI3K signal. However, the association between the actin cytoskeleton and the Fas-mediated signal of apoptosis is still a matter of debate because, rather to inhibit the Fas signal, the use of inhibitors of the actin filament elongation (e.g., cytochalasin D) has been reported to amplify or did not alter the apoptotic signal in epithelial cells (e.g., ovarian cancer cell lines or in airway epithelial cells) or in the T leukemia Jurkat cell line, respectively (47, 48).

Alternatively other molecular targets could play a role in the redistribution of Fas into the lipid rafts, as recently palmitoylation of Fas has been reported to promote the redistribution of Fas into microdomains (49). Therefore, it is conceivable that enzymes involved in the palmitoylation of proteins or other regulatory factors controlling the autoacylation process could be key components in the lipid raft redistribution of Fas and then could be considered as potential targets modulated by PI3K signaling pathway.

The antiapoptotic PI3K signal is found constitutively activated in numerous types of tumors, leading to the proposal that PI3K inhibitors can be used as therapeutic anticancer agents. However, because this pathway has pleiotropic effects in the cell, the currently available agents are likely to be too toxic, precluding their clinical use (6). We believe the exhaustive characterization of the molecular ordering between the blockade of the PI3K activity and the redistribution of Fas into the lipid rafts to be of interest to pinpoint more specific targets whose inhibition will be entailed with more limited side effects.

Materials and Methods

Cell Lines and PBLs

The leukemia cell lines Jurkat and CEM, the promyelocytic leukemia cell line HL-60, and the lymphoma cell line H9 were grown in RPMI 1640 supplemented with 8% heat-inactivated FCS and 2 mmol/L L-glutamine in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were isolated by Ficoll centrifugation and washed twice in PBS. Monocytes were removed by a 2-h adherence step, and the naive PBLs were incubated overnight in medium supplemented with 1 µg/mL phytohemagglutinin (Sigma). Cells were washed extensively and incubated in the culture medium supplemented with 1,000 units/mL of recombinant interleukin-2.

The cell line CEM-IRC was selected as follows: parental CEM was cultured for a month in a medium supplemented with homemade soluble FasL (500 ng/mL; ref. 24). Then, soluble FasL resistant cells were cloned by limiting dilutions and Fas expression at the surface of the clones was analyzed by flow cytometry using an anti-Fas mAb (clone 5D7). Jurkat cells (5×10^6 in 0.3 mL) were electroporated with 10 µg of C-FADD containing pcDNA3 or empty vector at 300 V with one pulse using the BTM 830 electroporation generator (BTX Instrument Division). Twenty-four hours later, G418 (Life Technologies) was added to the cultures at a final concentration of 2 mg/mL. Stable clones were isolated by limiting dilution.

Antibodies and Other Reagents

The anti-human Fas mAb 5D7, the blocking anti-human FasL mAb 10F2, and the isotype-matched negative control 1F10 (IgG) mAb were all generated in the laboratory. The blocking anti-human Fas mAb ZB4 (IgG) was purchased from Immunotech. The anti-human Fas mAb used for confocal microscopy analysis is the clone DX2 from BD Biosciences. Anti-whole protein Akt and phospho-Akt specific antisera were from Cell Signaling Technology, Inc. Anti-p56^{Lck} mAb was from Transduction Laboratories (BD Biosciences). Edelfosine, LY294002, and wortmannin were purchased from Merck Biosciences. α -Cyclodextrin and M β CD were from Sigma.

Detergent Lysis Experiments and Western Blot Analysis

Cells were lysed for 30 min at 4°C in lysis buffer [25 mmol/L HEPES (pH 7.4), 1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, supplemented with a mix of protease inhibitors (Sigma)]. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid method (Sigma) according to the manufacturer's protocol. Proteins were separated by SDS-PAGE on a 12% gel in reducing conditions and transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham). The membrane was blocked 1 h with TBS-Tween 20 [50 mmol/L Tris, 160 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20 (pH 7.8)] containing 5% dried skimmed milk, and all subsequent steps were done in this buffer. Specific primary antibody was incubated overnight at 4°C. After intensive washes, the peroxidase-labeled anti-rabbit (CliniSciences) was added for 1 h and the proteins were visualized with the enhanced chemiluminescence substrate kit (Amersham).

Competitive PIP₃(4,5) ELISA

Using the competitive PIP₃ Mass ELISA kit (Echelon Biosciences, Inc.), we determined the relative amount of PIP₃ present in cells treated or untreated by the different PI3K-specific inhibitors and edelfosine. Briefly, cells were treated or untreated with the indicated agents and lipids were extracted following the recommendation of the manufacturer. For each condition, the purified PIP₃-containing suspension was treated exactly as recommended by the manufacturer and the colorimetric signal was measured at 450 nm using the Titertek Labsystems Multiskan reader.

Cell Death Assays

Quantification of fragmented DNA, also called sub-G₁ population, was done as previously described (5). Briefly, treated or untreated cells (0.2×10^6) were harvested and incubated 4 h in 300 μ L of buffer containing 0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X-100, and 50 μ g/mL of propidium iodide (Sigma). Cell fluorescence was analyzed using flow cytometry analysis. In experiments using M β CD, Jurkat cells were preincubated 30 min in serum-free medium with 5 mmol/L M β CD or α -cyclodextrin (negative control) at 37°C and then washed before the addition of the different inducers in medium containing no FCS.

Cell viability was also assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, exactly as previously described (50). In brief, 2×10^4 cells were cultured for 16 h in flat-bottomed, 96-well plates with the

indicated concentrations of the apoptosis inducer in a final volume of 100 μ L. MTT (15 μ L, 5 mg/mL in PBS) solution was added, and after 4 h of incubation at 37°C, the absorbance was measured at 570 nm using the Titertek Labsystems Multiskan reader.

Flow Cytometry Staining of Cells

All the steps were done at 4°C. Cells were washed in PBS/1% bovine serum albumin and incubated 30 min with 10 μ g/mL of anti-Fas mAb (clone 5D7) or isotypic mAb (1F10). Fas staining was revealed using a phycoerythrin-coupled goat anti-mouse antibody and analyzed with a three-color FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson).

Sucrose Gradient Fractionation

Cells were treated or untreated with the indicated PI3K inhibitor for 4 h. Then, cells were harvested, washed twice in PBS, and lysed exactly as previously described (50). Briefly, indicated cells (10^8) were incubated with 1 mL of lysis buffer for 30 min at 4°C. The lysate was mixed with an equal volume of 85% (w/v) sucrose-containing lysis buffer, transferred to a centrifuge tube, and overlaid with 5 mL of 30% and 3 mL of 5% sucrose solutions. The sucrose gradient was centrifuged for 20 h at 4°C in a Kontron TST4114 rotor at $250,000 \times g$, and fractions were harvested from the top to the bottom of the centrifuge tube.

Immunofluorescence Staining

Cells were incubated with the indicated chemical for 4 h at 37°C and allowed to adhere for 5 min at room temperature to poly-L-lysine coated slides (ESCO, VWR). Cells were then fixed in PBS containing 2% formaldehyde for 15 min, washed twice in PBS, and treated for 10 min with 50 mmol/L glycine in PBS to quench the aldehyde groups. Cells were incubated with Alexa Fluor 555 labeled cholera toxin B and anti-Fas mAbs (clone DX2) in PBS/1% bovine serum albumin for 30 min at 4°C, rinsed five times, and incubated for 30 min with the Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-mouse antibody (Molecular Probes) in PBS/1% bovine serum albumin. Slides were washed with PBS, dried, and mounted with Fluoroprep (Biomérieux). Images were acquired and processed with a confocal microscope (Leica SP5) with a 63 $\times$ objective.

Acknowledgments

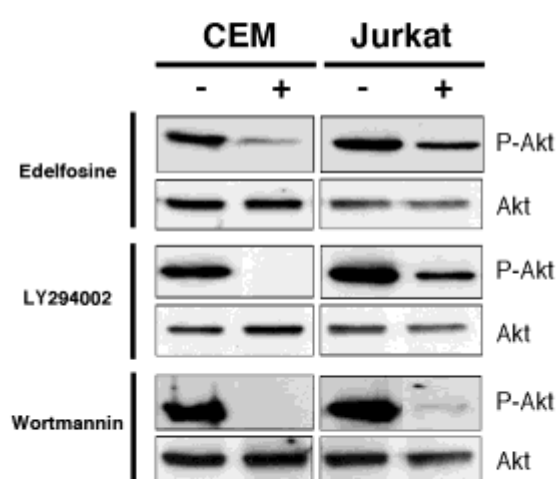
We thank Dr. Marcus Peter (Ben May Institute for Cancer Research, University of Chicago, Chicago, IL) for providing the C-FADD-containing pcDNA3 and Nathalie Sennat (Microscopy IFR66) for technical assistance.

References

- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449–56.
- Badier N, Su HC, Lenardo MJ. Genetic disorders of programmed cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2006;24:321–52.
- Fas SC, Fritsching B, Son-Payer E, Krammer PH. Death receptor signaling and its function in the immune system. *Curr Dir Autoimmun* 2006;9:1–17.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann L, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995;14:5579–88.
- Scaffidi C, Folia S, Srinivasan A, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998;17:1675–87.
- Wyman MP, Zvelebil M, Laffargue M. Phosphoinositide 3-kinase signaling—where way to target? *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:366–76.

7. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:489–501.
8. Oikarinen K, Vanhaesebroeck B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol* 2003;3:317–30.
9. Jones RG, Elford AR, Parsons MJ, et al. CD28-dependent activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly. *J Exp Med* 2002;196:335–48.
10. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 1995;3:87–98.
11. Kirchhoff S, Müller WW, Li-Weber M, Krammer PH. Up-regulation of c-FLIP β and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur J Immunol* 2000;30:2765–74.
12. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, et al. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997;278:687–9.
13. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972;175:720–31.
14. Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 1992;68:533–44.
15. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997;387:569–72.
16. Hueber AO, Bernard AM, Herincs Z, et al. An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep* 2002;3:190–6.
17. Legembre P, Daburon S, Moreau P, et al. Amplification of Fas-mediated apoptosis in type II cells via microdomain recruitment. *Mol Cell Biol* 2005;25:6811–20.
18. Muppá JR, Siegel RM. Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. *Nat Immunol* 2004;5:182–9.
19. Gajate C, Del Canto-Janez E, Acuna AU, et al. Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med* 2004;200:353–65.
20. Houligan WJ, Lohmeyer M, Wockman P, Choe SH. Phospholipid antitumor agents. *Med Res Rev* 1995;15:157–223.
21. Munder PG, Westphal O. Antitumoral and other biomedical activities of synthetic ether lysophospholipids. *Chem Immunol* 1990;49:206–35.
22. Gajate C, Mollinedo F. The antitumor ether lipid ET-18-OCH $_3$ induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* 2001;98:3860–3.
23. Varadhachary AS, Edsall M, Hazlton AM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase blocks CD95 aggregation and caspase-8 cleavage at the death-inducing signaling complex by modulating lateral diffusion of CD95. *J Immunol* 2001;166:6564–9.
24. Beneteau M, Daburon S, Moreau JF, et al. Dominant-negative Fas mutation is reversed by down-expression of c-FLIP. *Cancer Res* 2007;67:108–15.
25. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:31–9.
26. Xavier R, Brennan T, Li Q, et al. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 1998;8:723–32.
27. Legembre P, Daburon S, Moreau P, et al. Cutting edge: modulation of Fas-mediated apoptosis by lipid rafts in T lymphocytes. *J Immunol* 2006;176:716–20.
28. Ruiter GA, Zerp SF, Bartelink H, et al. Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs* 2005;14:167–73.
29. Freeborn RW, Wright KL, Burgess SJ, et al. Evidence that SHP-1 contributes to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate metabolism in T lymphocytes and can regulate novel phosphoinositide 3-kinase effectors. *J Immunol* 2002;169:5441–50.
30. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996;85:803–15.
31. Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* 1996;2:574–7.
32. Müller M, Strand S, Hug H, et al. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest* 1997;99:403–13.
33. Lacour S, Hamann A, Graziade S, et al. Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:3593–8.
34. Gajate C, Mollinedo F. Cytoskeleton-mediated death receptor and ligand concentration in lipid rafts forms apoptosis-promoting clusters in cancer chemotherapy. *J Biol Chem* 2005;280:11641–7.
35. Abenmouf MD, Magelães PJ, Rami SJ. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 2004;11:36–42.
36. Viola A, Schroeder S, Szalai-Baron Y, Lanzavecchia A. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 1999;283:680–2.
37. Gajate C, Mollinedo F. Edelfosine and perfosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood* 2007;109:711–9.
38. Khanna MG, Fuman DA. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res* 2005;65:2047–53.
39. Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, et al. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 2002;22:207–20.
40. Schneider P, Thome M, Burns K, et al. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF- κ B. *Immunity* 1997;7:831–6.
41. Choudhary PM, Eby M, Jassim A, et al. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF- κ B pathway. *Immunity* 1997;7:821–30.
42. Cremesti A, Paris F, Gisselbrecht H, et al. Ceramide enables fas to cap and kill. *J Biol Chem* 2001;276:23954–61.
43. Huang Y, Burckhardt JK. T-cell-receptor-dependent actin regulatory mechanisms. *J Cell Sci* 2007;120:723–30.
44. Lozupone F, Lugisi L, Matarrese P, et al. Identification and relevance of the CD95-binding domain in the N-terminal region of ezrin. *J Biol Chem* 2004;279:9199–207.
45. Gautreau A, Pouillet P, Louvard D, Aspin M. Ezrin, a plasma membrane-microfilament linker, signals cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7300–5.
46. Stickney JT, Bacon WC, Rojas M, et al. Activation of the tumor suppressor merlin modulates its interaction with lipid rafts. *Cancer Res* 2004;64:2717–24.
47. Celeste Morley S, Sun GP, Bierer BE. Inhibition of actin polymerization enhances commitment to and execution of apoptosis induced by withdrawal of trophic support. *J Cell Biochem* 2003;88:1066–76.
48. Meng Y, Kang S, Fishman DA. Lysophosphatidic acid inhibits anti-Fas-mediated apoptosis enhanced by actin depolymerization in epithelial ovarian cancer. *FEBS Lett* 2005;579:1311–9.
49. Chakraborty K, Herincs Z, Houbt S, et al. Palmitoylation is required for efficient Fas cell death signaling. *EMBO J* 2007;26:209–20.
50. Legembre P, Moreau P, Daburon S, et al. Potentiation of Fas-mediated apoptosis by an engineered glycosylphosphatidylinositol-linked Fas. *Cell Death Differ* 2002;9:329–39.

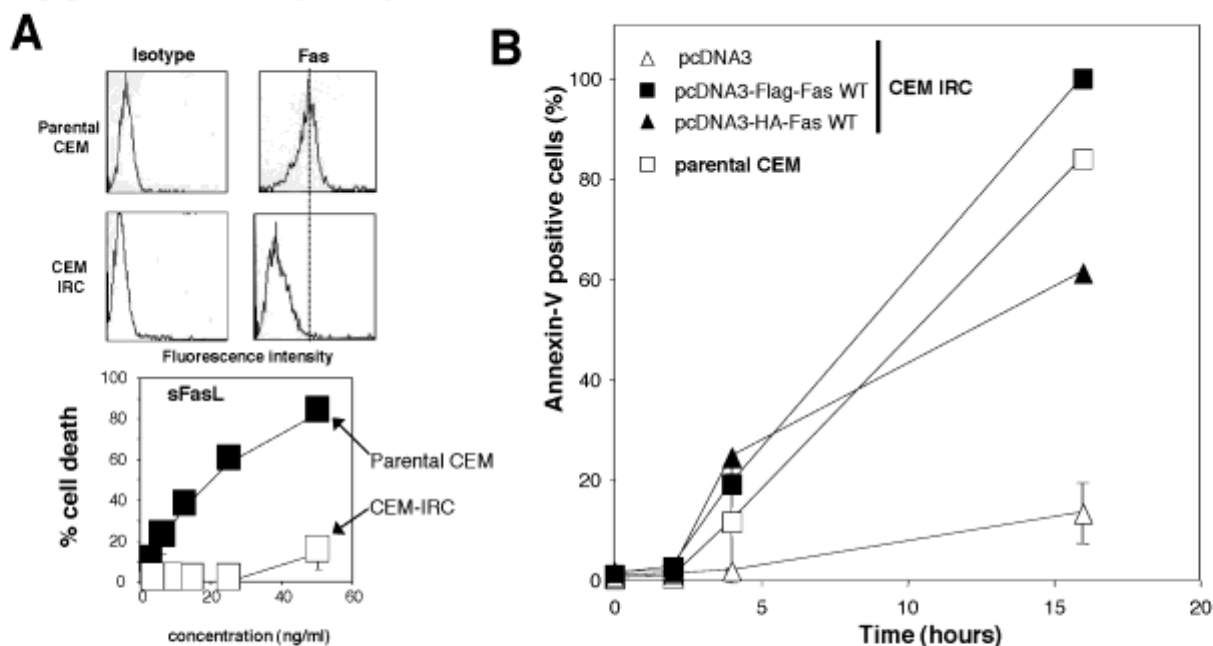
Supplementary Figure 1



Supplementary Fig.1 : Edelfosine and PI3K inhibitors prevents the activation of Akt.

Cell lines harboring a strong PI3K activity, CEM and Jurkat were incubated 4 hours with LY294002 (25 μ M), wortmannin (10 μ M) or Edelfosine (5 μ g/ml), then lyzed and 100 μ g of proteins were separated in a 12% SDS-PAGE . The quantity of the whole protein and the phosphorylated Akt were detected using specific antibodies by western blot. Each immunoblot is representative of at least three independent experiments.

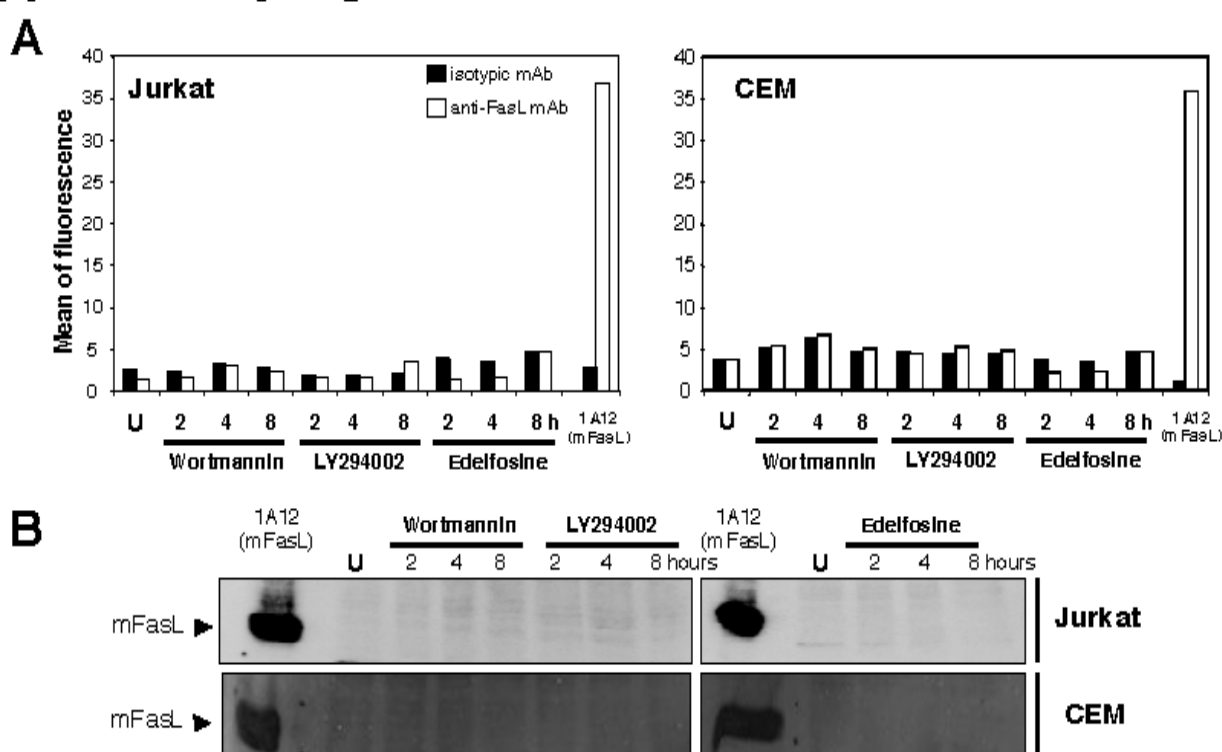
Supplementary Figure 2



Supplementary Fig.2 : Extensive characterization of the Fas-deficient lymphoma cell line termed CEM-IRC.

A. Flow cytometry analysis was used to determine the Fas expression in the parental and the CEM-IRC cell lines using an anti-Fas (clone DX2) or an isotypic mAb (upper panel). Using MTT assay, the apoptotic effect of FasL was assessed on the isolated clone (CEM-IRC) and compared to the parental cell line (lower panel). **B.** CEM-IRC was reconstituted with wild type Fas. Flag-Fas was kindly provided by Dr Giovina Ruberti (Institute of Cell Biology, Rome, Italy). CEM IRC was transiently transfected with different wild type Fas. 20 hours after transfection, living cells were isolated using the FICOLL method (see *Materials and Methods*) and immediately treated or untreated with soluble FasL (300 ng/ml) for the indicated times. Then cells were stained using FITC-labelled annexin-V and anti-HA (covance) or anti-Flag (Sigma) mAbs. HA-Fas and Flag-Fas was revealed using a secondary PE-coupled goat anti-mouse IgG antibody and analyzed by flow cytometry. Percentage of cell death in the different cell populations (Fas reconstituted cells or Fas deficient cells) was assessed as follows : $\left(\frac{\text{Annexin-V positive cells among the unstained, HA-Fas or Flag-Fas expressing cells}}{\text{Total unstained or HA-Fas or Flag-Fas expressing cells}} \right) \times 100$. Data shown represent mean $\pm$ SD representative of three independent experiments.

Supplementary Figure 3



Supplementary Fig 3. No FasL expression is detected upon Edelfosine or PI3K-inhibitor treatments.

The mouse lymphoma cell line 1A12 was kindly provided by Dr Nagata (Osaka, Japan). 1A12 expresses membrane bound FasL. **A**. Jurkat and CEM cell lines were untreated (U) or treated with wortmannin (10 μ M), LY294002 (30 μ M) or edelfosine (5 μ g/ml) for the indicated times. Cells were washed and membrane FasL expression was analyzed by flow cytometry using an anti-FasL mAb (clone 14C2) or an isotypic mAb (anti-LIF mAb clone 1F10). **B**. Cells were treated or untreated with the doses of PI3K inhibitors indicated above for the indicated times, then cells were lysed and 100 μ g of protein were loaded and resolved in a 12% SDS-PAGE. The expression of FasL was quantified by immunoblot using an anti-FasL mAb (clone G247-2, BD biosciences).

3) Principaux résultats

1) *L'édelfosine modifie la distribution de CD95 à la membrane et inhibe la voie PI3K.*

L'édelfosine a été décrite comme étant capable d'induire un signal apoptotique qui est dépendant de CD95, mais également dépendant de la redistribution de ce récepteur dans les microdomaines membranaires. Afin de confirmer ces observations, nous avons dans un premier temps incubé la lignée Jurkat Q257K, qui est résistante au signal CD95 [458], avec l'édelfosine. La résistance au signal CD95 dans les Jurkat Q257K, entraîne également une inhibition du signal apoptotique induit par l'édelfosine, comparativement à la lignée parentale (figure 1A). Dans un deuxième temps, nous avons observé que la déstructuration des microdomaines via la M β CD inhibe le signal apoptotique induit par l'édelfosine (figure 1B).

En conclusion, l'édelfosine induit un signal apoptotique dépendant de CD95 et de l'intégrité des radeaux lipidiques.

2) *L'édelfosine et les inhibiteurs de la PI3K induisent préférentiellement un signal de mort dans les cellules possédant une forte activité PI3K.*

Afin de déterminer si le signal de mort induit par l'édelfosine est dû à l'inhibition de la PI3K, nous avons incubé les lignées de type II Jurkat et CEM, qui possèdent une forte activité PI3K (figure 1A), et les lignées de type I SKW6.4 et H9, qui possèdent une activité PI3K intermédiaire ou faible respectivement (figure 1A), avec des inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K (wortmannine et LY294002) et l'édelfosine. Comme le montre la figure 1C, de manière similaire à l'édelfosine, les inhibiteurs de la kinase PI3K induisent un signal apoptotique plus efficace dans les cellules de type II comparé aux cellules de type I. Ce résultat confirme la spécificité des inhibiteurs utilisés vis-à-vis de la voie PI3K. Ces résultats ont été également confirmés sur des PBLs. En effet, les PBLs activés présentent une forte

activité PI3K comparativement aux PBLs naïfs, et meurent de façon plus efficace après incubation avec les inhibiteurs de la PI3K.

Comme une forte corrélation existe entre la sensibilité des cellules à l'édelfosine et l'état d'activation d'Akt (type I/type II), ces résultats suggéraient que l'édelfosine pourrait induire un signal de mort CD95 via son action sur la voie de signalisation PI3K.

3) L'inhibition de l'activité PI3K induit un signal de mort dépendant de CD95, mais indépendant de l'interaction CD95/CD95L.

Afin de démontrer que l'inhibition de la voie PI3K induit un signal de mort dépendant de la signalisation CD95, nous avons utilisé deux lignées cellulaires: la lignée CEM-IRC, qui est une lignée exprimant peu de CD95 à sa surface (Figure S2A), et la lignée Jurkat pcDNA3 C-FADD, qui est également résistante au signal CD95 via la sur-expression d'un dominant négatif de FADD, la protéine C-FADD. Comme le montre les figures 3A et 3B, la CEM-IRC et la Jurkat pcDNA3 C-FADD montrent une résistance au signal apoptotique induit par les inhibiteurs de la PI3K et à l'édelfosine.

Ces résultats semblaient indiquer que l'inhibition de la voie PI3K induisait un signal apoptotique dépendant de la voie CD95. Cependant, la diminution de la sensibilité dans ces cellules n'est jamais complète, ce qui indique que la voie PI3K contrôle des mécanismes apoptotiques autres que CD95 qui participent de manière redondante à l'induction de la mort des cellules lors de l'inhibition de cette voie oncogénique.

Il a été démontré que des agents anticancéreux comme la doxorubicine ou la bleomycine [459, 460], induisent un signal apoptotique dépendant de CD95, via l'expression *de novo* de CD95L. D'autres agents, comme l'édelfosine ou le cisplatine [343, 461], éliminent aussi les cellules tumorales via un signal CD95 mais indépendamment de l'expression de CD95L. Ce dernier processus impliquerait la redistribution de CD95 dans les microdomaines. Le prétraitement des cellules avec des anticorps bloquants, inhibent le signal médié par l'addition de CD95L, mais reste inefficace pour bloquer la mort induite par le LY294002 ou l'édelfosine. Ce résultat semble indiquer que le contact CD95/CD95L n'est pas nécessaire au

déclenchement du signal apoptotique CD95 lors de l'inhibition de la voie PI3K. De plus, aucune expression de CD95L n'a été détectée dans les Jurkat et les CEM (Figure S3).

Ces résultats indiquent que l'expression de CD95L, tout comme l'interaction CD95/CD95L, ne sont pas requises pour la transmission du signal de mort induit par les inhibiteurs de la PI3K. Ces résultats suggèrent donc que ces inhibiteurs induisent un signal CD95 indépendamment du ligand CD95L.

4) L'inhibition de la voie PI3K induit une relocalisation de CD95 dans les microdomaines

Comme l'édelfosine induit la relocalisation de CD95 dans les microdomaines par un mécanisme inconnu, nous avons cherché à savoir si l'inhibition de la voie PI3K permet cette relocalisation. Nous avons dans un premier temps isolé les radeaux lipidiques de nos lignées cellulaires, via une ultracentrifugation en gradient discontinu de saccharose, puis analysé la présence de CD95 dans les différentes fractions d'ultracentrifugation. Dans la figure 4A, on peut observer que dans les cellules de type II (Jurkat et CEM), qui présentent une forte activité PI3K, peu de CD95 est localisé dans les radeaux lipidiques. A l'inverse, dans la lignée de type I (H9) qui montrent une activité PI3K faible, CD95 est enrichi dans les microdomaines. L'inhibition de la PI3K dans les lignées Jurkat et CEM entraîne la redistribution d'une partie significative de CD95 dans les radeaux lipidiques (figure 4B).

Afin de confirmer ces résultats, nous avons étudié la localisation de CD95 vis-à-vis des microdomaines, via une analyse microscopique. Les cellules Jurkat et CEM ont été traitées par l'édelfosine et les inhibiteurs de la PI3K, puis marquées par un anticorps anti-CD95, et par la CTB [329]. Comme le montre la figure 5, en absence de traitement, CD95 est distribué de manière homogène à la surface de la cellule, et ne colocalise pas avec les microdomaines dans les deux lignées. A l'inverse, les inhibiteurs de la PI3K induisent la formation d'un « cluster » de CD95 à un pôle de la cellule, qui est colocalisé avec les microdomaines. Il est à noter que seule une partie des microdomaines contient CD95. Ce résultat suggère que différents types de radeaux lipidiques, qui pourraient transmettre des signaux distincts.

4) Conclusion

Au cours de cette étude nous avons montré que l'inhibition de la voie PI3K induit la formation rapide de « cluster » de CD95, ainsi que sa redistribution dans les radeaux lipidiques. Nous avons également démontré que l'agent anticancéreux, édelfosine, est capable d'inhiber la PI3K dans des lignées leucémiques ainsi que dans les lymphocytes T activés. Cette inhibition entraîne I) la formation de CD95-CAP de l'ordre du micromètre et ii) l'induction d'un signal apoptotique CD95. A notre connaissance, nous montrons pour la première fois que l'édelfosine redistribue CD95 dans les microdomaines via l'inhibition de la voie PI3K.

Article 2

La voie PI3K/Akt protège les cellules tumorales du signal CD95 en empêchant leur distribution dans les radeaux lipidiques

Article 2 : PI3K/Akt signaling pathway prevents the CD95-mediated apoptotic signal through exclusion of the death receptor from lipid rafts.

Mathieu Pizon^{1,2}, Benjamin Chaigne-Delalande^{1,2}, Sophie Daburon^{1,2}, Michel Castroviejo^{2,3}, Patrick Moreau^{2,4}, Jean-François Moreau^{1,2,5} and Patrick Legembre^{1,2,6}.

¹CNRS UMR 5164, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

²Université de Bordeaux-2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

³CNRS UMR-5234, Laboratoire de Microbiologie Cellulaire et Moléculaire et Pathogénicité, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

⁴CNRS-UMR 5200, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

⁵CHU Bordeaux, Place Amélie Raba Léon, Bordeaux 33076, France.

⁶Current address: UPRES EA SeRAIC, EA 4427, Signalisation et réponses aux agents infectieux et Chimiques Faculté de Pharmacie, 2 av Prof Léon Bernard, 35043 Rennes cedex, France. E-mail: patrick.legembre@inserm.fr

1) Introduction

Nous avons montré dans la précédente étude, que la voie PI3K est responsable du maintien de CD95 en dehors des radeaux lipidiques [462]. Notre but lors de cette étude a été d'aller plus loin dans l'analyse du signal de mort induit lors de l'inhibition de la voie PI3K/Akt.

2) Méthodologie générale

La formation d'agrégats du récepteur CD95 à la membrane lors de l'inhibition de la voie PI3K a été étudiée par chromatographie d'exclusion. La formation du DISC a été analysée via une immunoprécipitation de la protéine CD95. La présence des principaux constituants du DISC a été révélée par western blot.

L'implication des microdomaines dans le signal apoptotique induit par l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt a été étudiée par imagerie, via un marquage de la protéine CD95 et des microdomaines, et aussi de façon biochimique, par isolement des radeaux lipidiques en utilisant l'ultracentrifugation en gradient discontinu de saccharose. De plus, l'utilisation de la M β CD (*methyl- β -cyclodextrine*) nous a permis de définir, de manière directe, l'implication des radeaux lipidiques dans le signal apoptotique induit lors de l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt.

Nous avons utilisé différents inhibiteurs afin de bloquer la voie PI3K/Akt : I) des inhibiteurs pharmacologiques de PI3K (Wortmannine et LY294002) et d'Akt (Akt inhibiteur XIII et X), et II) un dominant négatif d'Akt, DN-Akt (T308A/S473A). Ce mutant a été réalisé par mutagenèse dirigée, et après transfection, des cellules leucémiques T Jurkat exprimant ce mutant de façon constitutive ont été obtenues par dilutions limitantes.

ARTICLE 2

PI3K/Akt signaling pathway prevents the CD95-mediated apoptotic signal through exclusion of the death receptor from lipid rafts.

Authors: Mathieu Pizon^{1,2}, Benjamin Chaigne-Delalande^{1,2}, Sophie Daburon^{1,2}, Michel Castroviejo^{2,3}, Patrick Moreau^{2,4}, Jean-François Moreau^{1,2,5} and Patrick Legembre^{1,2,6}.

Author Affiliations:

¹CNRS UMR 5164, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

²Université de Bordeaux-2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

³CNRS UMR-5234, Laboratoire de Microbiologie Cellulaire et Moléculaire et Pathogénicité, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

⁴CNRS-UMR 5200, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

⁵CHU Bordeaux, Place Amélie Raba Léon, Bordeaux 33076, France.

⁶Current address: UPRES EA SeRAIC, EA 4427, Signalisation et réponses aux agents infectieux et Chimiques Faculté de Pharmacie, 2 av Prof Léon Bernard, 35043 Rennes cedex, France. E-mail: patrick.legembre@inserm.fr

Key words: Akt, Apoptosis, CD95, Lipid rafts, PI3K.

Short title: The Akt signal excludes CD95 from microdomains.

Abstract

Immune system eliminates infected or transformed cells through the induction of the death receptor CD95. CD95 engagement drives the recruitment of the adaptor protein FADD, which in turn aggregates and activates initiator caspases (*i.e.*, -8 and -10). The CD95-mediated apoptotic signal relies on the capacity to form the CD95/FADD/caspases complex termed the DISC. According to the DISC formation, cells have been discriminated between type I (huge DISC) and type II cells (weak DISC). Intriguingly, we observed that CD95 was gathered into lipid rafts in type I cells, whereas the death receptor was excluded from these domains in type II cells. Herein, we show that inhibition of the PI3K class IA or the serine-threonine kinase Akt in type II cells promotes the redistribution of CD95 into lipid rafts, the DISC formation and the ignition of the apoptotic signal. Strikingly, these molecular events take place independently of the presence of CD95L. Overall, these findings highlight that the PI3K/Akt intracellular signaling pathway, whose activity is found increased in numerous malignant cells, raises the apoptotic threshold of CD95 by excluding the receptor from the lipid rafts.

Introduction

The death receptor CD95 (Fas/APO1) belongs to the tumor necrosis factor (TNF) receptor family. Whereas CD95 is ubiquitously expressed, its cognate ligand, CD95L, displays a more restricted expression pattern. This apoptotic ligand is found at the plasma membrane of activated T lymphocytes [463] and natural killer (NK) cells [464] upon which it participates in the elimination of transformed and infected cells. A common feature of the death receptors is the presence of an intracellular domain termed Death Domain (DD). Binding of CD95L to CD95 triggers the recruitment at the CD95-DD level of the adaptor protein *Fas-Associated Death Domain protein* (FADD), which in turn aggregates proteases called caspase-8 and -10. The close vicinity of these caspases facilitates their activation and the induction of the caspase cascade culminating in the death of the cell. The CD95/FADD/caspase-8 complex is called DISC for *Death Inducing Signaling Complex* [39]. Seeking for molecular mechanisms modulating the initial steps of CD95 signal, we and others found that redistribution of CD95 into nanometer to micrometer-sized domains of the plasma membrane termed lipid rafts enhanced the formation of the DISC and the transmission of apoptosis [169, 180, 462, 465]. Recent studies underlined that certain anti-tumoral drugs eliminated malignant cells through the redistribution of CD95 into lipid rafts and the induction of a CD95L-independent apoptotic signal (*e.g.*, rituximab [466], resveratrol [345, 467], edelfosin [344, 462], cisplatin [461]). Hitherto, the molecular mechanisms contributing to the control of the plasma membrane distribution of CD95 and the subsequent amplification or blockage of the apoptotic signal remain poorly understood.

According to the signaling pathway triggered upon CD95 engagement, cells have been discriminated, both *in vivo* and *in vitro*, in type I or type II cells [468]. In this regard, the DISC is efficiently formed in type I cells (*e.g.*, activated lymphocytes) and the huge amount of activated caspase-8 directly activates executioner caspases -3, -6 and -7, which in turn process various intracellular substrates. In contrast, type II cells display an impaired DISC formation and the release of a weak amount of caspase-8, which is sufficient to activate the mitochondrion-driven apoptotic pathway [212]. Recent evidences pinpointed that expression level of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) accounts for the difference between type I and type II cells [259]. XIAP binds executioner caspases and blocks their catalytic activity [299]. The displacement of XIAP/caspase interaction is achieved upon the induction of the mitochondrion-dependent apoptotic signal and so, the release of the pro-apoptotic factor called direct IAP-binding protein with low pI (DIABLO) from the intermembrane space of

mitochondria [245, 248]. Jost and colleagues observed that the higher amount of XIAP found in type II cells than in type I cells explained the pivotal role played by the mitochondria in the CD95-mediated apoptotic signal of type II cells [259]. The phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN), which antagonizes the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) seems to participate in the type I/II phenotype since it hampers the induction of the mitochondria-dependant apoptotic signal in type I cells [306]. Nevertheless, release by the mitochondria of pro-apoptotic factors remains a distal event in the CD95 molecular ordering as compared to the DISC formation, which is the initial step controlling the commitment of a tumor cell to type I or type II branch.

The PI3K signal participates in various cellular processes such as cell proliferation, migration, survival and cell growth. The class I PI3K phosphorylates plasma membrane phospholipids and generates a second messenger termed phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate (PIP₃). In turn, PIP₃ serves as docking site for various signaling factors such as the serine-threonine kinase Akt. The re-localization of the cytosolic Akt at the plasma membrane leads to its activation via phosphorylation by the PI3K-dependent kinase-1 (PDK1) at Thr³⁰⁸ and by mTOR (mammalian target of rapamycin) complex-2 (TORC2) at Ser⁴⁷³. Akt plays pivotal role in cell survival. For instance, activation of Akt prevents cell death via the phosphorylation and the inhibition of various apoptotic factors such as Bad [444, 445] and caspase-9 [446]. Intriguingly, activation of PI3K/Akt resulted in the resistance of activated lymphocytes to the CD95-mediated apoptotic pathway via the inhibition of DISC formation [457]. However hitherto, the PI3K-driven molecular mechanism impairing the DISC formation in activated lymphocytes remains to be unveiled. Herein, we show that inhibition of the PI3K/Akt axis contributes to the partition of CD95 into lipid rafts through a CD95L-independent process. In addition, the redistribution of CD95 into lipid rafts causes the aggregation of the death receptor, the DISC formation and the induction of the apoptotic signal.

Materials and Methods

Cell Lines

All cells were cultured in RPMI1640 supplemented with 8% heat-inactivated FCS and 2 mM L-glutamine in a 5% CO₂ incubator at 37°C. CEM-IRC (Ig-CD95L-Resistant Cell) was obtained as described previously [462]. Briefly, the leukemia T-cell line CEM was long-term cultured with stepwise increase in concentration of Ig-CD95L (up to 500 ng/ml). Ig-CD95L-resistant cells were cloned by limiting dilutions and CEM-IRC was isolated according to its low CD95-expression.

DNA constructs and transfection

The pcDNA3.1-human HA-tagged Akt1 was kindly provided by Dr B. Hemmings (Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Basel, Switzerland). We generated the DN-Akt (T308A, S473A) construct by site-directed mutagenesis using Quickchange II XL Kit (Stratagene, Agilent Technologies, Massy, France) with the following primers 5'gtgccaccatgaaggccttttgcggc3' (T308A) and 5'ttccccagttcgctactcggccag3' (S473A).

The leukemic T-cell line Jurkat (5×10^6) was electroporated with 10µg of plasmid at 300V with one pulse of 10 msec using the BTM 830 electroporation generator (BTX Instrument Division, Holliston, MA). Twenty-four hours later, 800 µg/ml of hygromycin (Clontech) was added. DN-Akt-expressing clones were isolated by limiting dilution.

Antibodies and Reagents

MβCD, DAPI, Alexa555-conjugated cholera subunit B and the anti-β-Actin mAb were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France). Anti-human CD95 (DX2), anti-FADD (clone1) and anti-p56Lck mAbs were purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). The homemade soluble CD95L was generated by fusing the Ig-domain of the leukemia inhibitory factor (LIF) receptor gp190 to the extracellular region of CD95L (a.a. 105 to 281) [469]. The anti-CD95L mAb 14C2 and its isotype-matched negative control mAb 1F10 (anti-LIF) were generated in the laboratory. Anti-Caspase-8 (C15) and the agonistict

anti-CD95 mAb APO1-1 were purchased from Axxora (Coger S.A., Paris, France). The anti-CD95 mAb (C-20) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-Akt and anti-phospho-Akt antisera were from Cell Signaling Technology, Inc (Boston, MA, USA). LY294002, Wortmannin, Akt inh-VIII and Akt inh-X were purchased from Merck Biosciences (Nottingham, UK).

Detergent Lysis experiments and Western Blot Analysis

Cells were lysed for 30 minutes at 4°C in lysis buffer [25 mM HEPES (pH 7.4), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, supplemented with a mix of protease inhibitors and phosphatase inhibitors (Sigma)]. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid method (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Brebières, France) according to the manufacturer's protocol. Proteins were separated by SDS-PAGE on a 12% gel in reducing conditions and transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare). The membrane was blocked 1h with TBS-Tween-20 (50 mM Tris (pH 7.8), 160 mM NaCl, 0.1% Tween-20) containing 5% dried skimmed milk, and all subsequent steps were done in this buffer. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. After intensive washes, peroxidase-labeled anti-rabbit (CliniSciences, Montrouge, France) or anti-mouse (GE Healthcare) was added for 45 min and the proteins were visualized with the enhanced chemiluminescence substrate kit (GE Healthcare).

Measure of cell death

Cell viability was assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, as previously described [341]. In brief, $4 \cdot 10^4$ cells were incubated for 16h with the indicated concentrations of the apoptosis inducer in a final volume of 100µL. Reaction was stopped by adding 15 µl of MTT solution (5mg/ml in PBS). The metabolic activity of the cells was followed by the appearance of formazan salt crystals, which were solubilized in 110 µl of 2-propanol complemented with 5% formic acid and absorbance was recorded at 570nm.

Cell death was also assessed by measuring the loss of mitochondrial potential ($\Delta\psi_m$). Cells were pre-incubated with DiOC6 (10nM) for 15min at 37°C and then stimulated with CD95L, APO1-1 or PI3K and Akt inhibitors. The drop of the electric mitochondrial potential ($\Delta\psi_m$) was assessed using flow cytometry.

For M β CD experiments, cells were pre-incubated with DiOC6, washed in serum-free medium and treated or untreated for 20 minutes with 2 mM of M β CD in serum-free medium at 37°C. Cells were washed and treated with the different inducers in FCS-free medium.

DNA fragmentation is an hallmark of apoptotic cells, thus to assess percentage of cells exhibiting a fragmented DNA (sub-G1 population), treated or untreated cells (1.10^5) were harvested and incubated for 4 hours in 100 μ l of a buffer containing 0,1% sodium citrate, 0,1% Triton X-100, and 50 μ g/ml of propidium iodide (Sigma). Cell fluorescence was analysed using flow cytometry analysis.

Flow cytometry analysis

All steps were performed at 4°C. Cells were washed in PBS/1% bovine serum albumin (BSA) and incubated 30 minutes with 10 μ g/ml of anti-CD95 (DX2), anti-CD95L (14C2), or isotypic (anti-LIF, clone 1F10) mAbs. CD95 and CD95L staining were revealed using a phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse antibody and fluorescence was assessed using FACSCanto™ II cytometer (BD Biosciences).

For Akt intracellular staining, cells were incubated for 10 minutes in PBS/1% BSA, washed in PBS and fixed with PBS/2% PFA for 30 minutes at 4°C. Cells were permeabilized using 200 μ l of methanol for 20 minutes at 4°C. After washes, intracellular amount of Akt was assessed by incubating cells for 30 minutes with an anti-Akt mAb followed by the Alexa488-conjugated goat anti-Rabbit (Molecular Probes). Stained cells were analyzed using BD FACSCanto™ II cytometer.

Immunofluorescence Staining

Cells were treated or untreated with Akt inhibitor-VIII for 4 hours at 37°C and let to adhere to poly-L-lysine-coated slides for 15 minutes at 37°C (ESCO, VWR). All subsequent steps were

performed at 4°C. Cells were then fixed in PBS containing 4% w/v paraformaldehyde for 10 minutes. The aldehyde groups were quenched for 10 minutes using a solution of PBS supplemented with 5% FCS. Cells were stained using the anti-CD95 mAb (Clone DX2) for 30 minutes, rinsed three times, and then incubated with a secondary Alexa488-conjugated goat anti-rabbit. To follow lipid rafts, cells were incubated with 1.5 µg/ml of Alexa555-labeled cholera toxin subunit B for 30 minutes at 4°C. Stained cells were then fixed with PBS/4% formaldehyde and the slides were dried and mounted with Fluoroprep (Biomérieux). Images were acquired and processed with a confocal microscope (Leica SP5) with a 63x objective.

DISC Analysis

Cells (5×10^7 per condition) were treated with control medium (DMSO) or 5 µM of wortmannin for 4 hours at 37°C, then cells were immediately placed at 4°C and incubated with 1 µg/ml of APO1-3 for 15 minutes at 4°C. Cells were lysed. Lysate protein content was determined by bicinchoninic assay and equalized prior to immunoprecipitation. CD95 was immunoprecipitated by adding protein A-sepharose beads (Sigma) for 2h at 4°C. Beads were extensively washed in lysis buffer and the CD95-associated immunocomplex was revealed by western blot.

For the DISC analyses in DN-Akt-expressing Jurkat, cells were incubated with 1 µg/ml APO1-3 for 15 minutes at 37°C (stimulated) or 0°C (unstimulated), then cells were washed and lysed. CD95 was immunoprecipitated by adding protein A-sepharose beads. Beads were washed, the immunoprecipitated complex was resolved by SDS-PAGE and immunoblots were performed for CD95/FADD/caspase-8 using specific antibodies.

Sucrose gradient fractionation

Cells (1×10^8 per condition) were harvested, washed twice with PBS, and lysed as described previously [341]. Briefly, indicated cells were lysed with 500 µl of lysis buffer for 30 minutes

at 4°C. Total lysate was mixed with an equal volume of 85% (w/v) sucrose-containing lysis buffer, transferred to a centrifuge tube, and overlaid with 4 ml of 30% (w/v) sucrose-containing lysis buffer and 1 ml of 5% (w/v) sucrose-containing lysis buffer. The sucrose gradient was ultracentrifuged at 200000g for 20 hours at 4°C and fractions were harvested from the top to the bottom of centrifuge tubes and analyzed by immunoblot.

Gel Filtration

Treated or untreated cells ($5 \cdot 10^7$ cells) were lysed with 200 μ l of lysis buffer [25 mM HEPES (pH 7.4), 1% Triton X100 reduced (Sigma), 150 mM NaCl, supplemented with a mix of protease inhibitors and phosphatase inhibitors (Sigma)]. Lysate was resolved using a wide range fractionation Superose 6 10/30 column (GE Healthcare). 50 Fractions were harvested, and pooled to obtain 9 samples. Finally, 50 μ L of each fraction was loaded into a 12% SDS-PAGE and immunoblots were performed using anti-CD95 (C-20), anti-Caspase-8 (C15) and anti-Lck mAbs.

Results

The PI3K signal controls the plasma membrane distribution of CD95

We recently showed that class I PI3K plays a pivotal role in maintaining CD95 outside the lipid rafts [462]. We next wondered whether the plasma membrane re-localization of CD95 in PI3K-inhibited cells contributed to the clustering of the death receptor, the formation of the DISC and the subsequent induction of cell death. To decipher the impact of the PI3K signal on the plasma membrane distribution of CD95, we analyzed the effect of PI3K inhibitors (wortmannin and LY294002) on the leukemic T-cell line Jurkat, which displays a strong and constitutive PI3K activation [462]. Using gel filtration chromatography, we observed that PI3K inhibition drove the formation of CD95-containing heavy macromolecular complexes as compared to resting cells (figure 1A). Indeed, while the fractions 1 and 2 encompassing molecular complexes heavier than 1 megadalton, contained only 2% of the total amount of CD95 in the untreated Jurkat T-cells, the PI3K inhibition raised this amount up to 37% (figure 1A). Similarly, PI3K inhibition increased the amount of caspase-8 eluted in fractions 1 and 2 from 18% to 35% (figure 1A and 1B). Since these heavy complexes gathered both the death receptor CD95 and its downstream effector caspase-8, we assumed that PI3K inhibition induced formation of the DISC. To prove this assumption, Jurkat cells were incubated for 4 hours with wortmannin or LY294002 (data not shown), and CD95 was immunoprecipitated (figure 1C). We found that inhibition of the PI3K cue resulted in the association of FADD to CD95 and the subsequent recruitment of the initiator caspase-8 (figure 1C). To rule out that PI3K inhibition caused the redistribution of CD95 into lipid rafts due to the *de novo* expression of CD95L, we assessed the presence of CD95L in treated and untreated cells using flow cytometry (plasma membrane CD95L, figure S1A) and immunoblots (total CD95L, figure S1B). No trace of CD95L was detected either by flow cytometry or immunoblots (figure S1A and S1B). These findings indicated that the “PI3K-driven”-DISC formation occurred independently of presence of CD95L.

We previously reported that PI3K inhibition leads to the redistribution of CD95 into lipid rafts [462]. We further explored whether the DISC formation and the apoptotic signal observed upon PI3K inhibition relied on the redistribution of CD95 into these domains. Using non-cytotoxic dose of the cholesterol chelator M β CD, it is possible to dismantle the lipid raft structures [335]. Pre-treatment of cells with M β CD abrogated the DISC formation observed

upon inhibition of PI3K (figure 1D) and furthermore, significantly impinged on the subsequent apoptotic signal (figure 1E). Overall, these results underlined that inhibition of the pro-oncogenic PI3K activity promoted clustering of CD95, formation of the DISC and induction of a lipid raft-dependent and CD95L-independent apoptotic signal.

Akt inhibition triggers redistribution of CD95 into lipid rafts and induction of a CD95-dependent apoptotic signal.

The serine/threonine kinase Akt is a downstream effector of the PI3K activation, whose activity contributes to numerous cellular processes such as proliferation, differentiation, migration or survival. To decipher the signaling pathway induced by PI3K that contributes to the prevention of CD95 clustering into lipid rafts and the induction of the apoptotic signal, we studied whether the serine-threonine kinase Akt controlled the plasma membrane distribution of CD95. Phosphorylation of the serine-threonine kinase Akt on threonine³⁰⁸ and serine⁴⁷³ is a hallmark of its activation. Using cell lines from hematological origins, we did not detect phosphorylation of Akt in the type I cell lines H9 and SKW6.4, while the kinase was constitutively activated in type II cells (see inset in figure 2A). More intriguingly, analysis of the lipid raft distribution of CD95 revealed that the death receptor was excluded from lipid rafts in type II cells (high PI3K activity), whereas it was found enriched in type I cells (low PI3K activity) (Figure S2A and B). Inverse correlation between PI3K-Akt activity and enrichment of CD95 into lipid rafts suggested that the kinase signaling pathway may prevent the partition of CD95 into lipid rafts. Akt inh-VIII is reported as a selective inhibitor of isoforms 1 and 2 of Akt [470], while the Akt inh-X is a pan-Akt inhibitor [471]. Both pharmacologic inhibitors triggered an apoptotic signal in type II cells, while they remained inefficient in type I cells (figure 2A). Next, to figure out the role played by CD95 in the apoptotic signal induced by Akt inhibitors, we assessed the cytotoxic action of the Akt inhibitors on CEM-IRC cell line. Compared to its parental counterpart, CEM-IRC cells exhibited a faint expression of CD95 (figure S3A) and resisted to CD95 stimulation (figure S3B). On the other hand, CEM and CEM-IRC cell lines displayed similar sensitivity to the apoptotic signal induced by TRAIL (figure S3B), another member of the TNF family, indicating that the intracellular apoptotic machinery remained unaltered in the CEM-IRC and that down-regulation of CD95 was the only cause of its CD95L resistance. As we can observe in figure 2B, CEM IRC was significantly less sensitive to the apoptotic signal induced by Akt

inhibition than the parental CEM. Next to strengthen that CD95 contributes to the apoptotic signal triggered upon Akt inhibition, we analyzed whether inhibition of Akt activity induced cleavage and activation of the initiator caspase-8. Similarly to the PI3K inhibitor wortmannin, Akt inh-VIII treatment caused the cleavage and activation of caspase-8 both in Jurkat and CEM T-cells (figure 2C). Altogether, these finding indicated that the apoptotic signal induced upon Akt inhibition occurs through CD95 engagement. Strikingly and similarly to PI3K inhibitors, we were able to detect neither alteration of the CD95 expression nor trace of CD95L in cells treated with Akt inhibitors VIII and X (figure S1C). Therefore, we assumed that Akt inhibition promotes the aggregation of CD95 and its redistribution into lipid rafts, which causes the induction of a CD95L-independent apoptotic signal. Lipid rafts can be followed using fluorochrome-coupled B-subunit of cholera toxin, a protein exhibiting a strong affinity for the monosialoganglioside GM1 found enriched into these domains. Treatment of the T-cells Jurkat and CEM with the Akt inhibitor VIII led to clustering of CD95 and its partition into lipid raft (figure 2D). In addition, dismantling of lipid rafts using M β CD prevented the apoptotic signal induced upon inhibition of Akt activity (figure 2E). Overall, these findings underlined that in type II cells, the serine-threonine kinase activity of Akt hampers the clustering of CD95, its partition into lipid rafts and the ignition of the apoptotic signal.

To confirm the role of Akt in the plasma membrane distribution of CD95, we next generated a dominant negative mutant of Akt (DN-Akt), which consisted of the replacement of both the threonine³⁷⁸ and the serine⁴⁷³ by alanine. The PTEN-deficient Jurkat cell line, which display a strong PI3K/Akt signaling pathway was transfected with DN-Akt and among one hundred clones analyzed, two independent clones harbored a stable over-expression of the DN-Akt (figure 3A). As expected, expression of DN-Akt in the leukemic T-cells reached a dramatic decrease in the phosphorylation status of the endogenous Akt (figure 3A). Next, we explored whether the genetic alteration of Akt activity partitioned CD95 into lipid rafts. Sucrose gradient fractionation revealed that reduction in the Akt activity promoted the re-localization of a significant percentage of CD95 into lipid rafts (figure 3B). Indeed, while in parental cells, only 9% of the total amount of CD95 was detected into lipid rafts, the distribution of CD95 into these **low-buoyant** density fractions reached 32 and 38% of total CD95 in DN-Akt clone 5 and 8, respectively (figure 3B). Importantly, we failed to detect any trace of CD95L in the DN-Akt-expressing Jurkat cells (data not shown).

Strikingly, in contrast to PI3K and Akt pharmacologic inhibitors, the redistribution of CD95 into lipid rafts observed in cells expressing the DN-Akt failed to induce apoptosis. It is envisioned that redistribution of CD95 into lipid rafts may be counteracted through the residual Akt activity observed in our clones (see figure 3A), which may maintain cell survival via either over-expression of anti-apoptotic factors or down-regulation in pro-apoptotic proteins. In both cases, the pre-distribution of a significant percentage of CD95 into lipid rafts should promote the DISC formation and the transmission of the apoptotic signal. Consistent with this hypothesis, expression of DN-Akt enhanced the recruitment of FADD to CD95 and the subsequent aggregation of caspase-8 at the DISC level in presence of CD95L (figure 3C). Furthermore, Akt inhibition not only promoted initial steps of the CD95 signal (*i.e.*, DISC formation) but also significantly enhanced CD95-mediated apoptotic signal (figure 4A). The Type II cell line Jurkat relies on the mitochondria to transmit an efficient apoptotic signal upon CD95L addition [212]. Therefore, we investigated whether the mitochondrion-dependent apoptotic pathway was altered by expression of the DN-Akt construct. Using staurosporine, a potent inducer of the mitochondria-dependent apoptotic pathway [472], we observed that DN-Akt expression did not modified the staurosporine-induced apoptotic signal, indicating that the Akt signal interfered with the CD95 cue upstream the mitochondrion-mediated apoptotic signal. Since CD95 is found partitioned into lipid rafts upon Akt inhibition, we next investigated the role of these domains in the CD95 signal. Consistent with the faint amount of CD95 found distributed into lipid rafts of type II cells such as Jurkat (figure 3B), chelation of cholesterol by M β CD did not alter the CD95 signal engaged by either the agonist antibody APO1-1 or CD95L in the parental cell (figure 4B and 4C). In contrast, the same pre-treatment reduced the sensitivity of the DN-Akt clones down to the level of the parental cell line (figure 4B and 4C). Importantly, the weak agonistic antibody APO1-1 has been previously used to discriminate between type I and type II cells [128]. Indeed, whereas type I cells from leukemic origin were efficiently eliminated by addition of APO1-1, type II leukemic cells resisted to the weak apoptotic inducer. We confirmed these findings since type I cells SKW6.4 (figure S4) and H9 (data not shown) were killed more efficiently than the type II cells Jurkat (figure S4) or CEM (data not shown). Interestingly, Jurkat cells in which the Akt activity was dampened, displayed a dramatic increase in its APO1-1 sensitivity and so, behaved as type I-like cells (figure S4). Overall, these findings demonstrated that the serine-threonine kinase Akt prevent the engagement of CD95 in malignant cells in part through the maintain of CD95 excluded from the lipid rafts.

Discussion

PI3K/Akt signal has been reported to play crucial role in cell survival, proliferation, migration and differentiation (EMT). Herein, we demonstrate that this oncogenic signal controls the plasma membrane distribution of the death receptor CD95 and thereby prevents its aggregation. Among the first, we revealed that the PI3K signal participates in the exclusion of CD95 from lipid rafts in leukemic cells [462]. In this work, we demonstrate that the loss of PI3K or Akt activities leads to the remodeling of plasma membrane distribution of CD95 and its redistribution into lipid rafts. This event promotes DISC formation and ignition of the apoptotic pathway independently of the *de novo* expression of CD95L. Interestingly, mammalian target of rapamycin (mTOR), whose activity is controlled, at least in part, by Akt [473] and whose activity participates in cell transformation [474], is not involved in redistribution of CD95 into lipid rafts and the subsequent induction of the apoptotic signal since the use of the mTOR inhibitor rapamycin is unable to trigger cell death in the leukemic T-cell lines CEM and Jurkat (figure S5). These findings highlight that while the PI3K/Akt axis is crucial in plasma membrane organization of CD95 and cell survival, the Akt/mTOR axis does not participate in this process.

Cells have been classified in type I/type II cells according to their effectiveness to form the DISC and their addiction to the mitochondria-mediated apoptotic pathway to activate executioner caspases (-3, -6, -7). While CD95 engagement in type I cells, rapidly and efficiently leads to the DISC formation and do not rely on activation of mitochondria to trigger cell death, type II cells form a faint DISC and undergo cell death through a mitochondria-dependent signal [212]. We recently found that type I cells exhibit a mesenchymal-like gene signature, whereas type II cells preferentially express epithelial-like genes [263]. These findings suggest that the epithelial to mesenchymal-like transition (EMT), which plays pivotal role in carcinogenesis, may switch off the CD95 signaling pathway and thus, allows pre-tumoral cells to evade immune surveillance. Recent studies underscored that the two main isoforms of Akt, Akt1 and Akt2 achieve opposite role in EMT. Although Akt1 over-expression promotes mammary tumor survival, it hampers cell invasiveness, a hallmark of mesenchymal-like cells [475], and besides, silencing of Akt1 unmasks the Akt2-dependent EMT process [431]. In contrast, Akt2 over-expression enhances a wortmannin-sensitive metastatic process in vitro (invasiveness) and in vivo (metastases) [476]. Finally, increase in the Akt2/Akt1 ratio has been reported to promote EMT [477]. Overall, these findings may be construed that up-regulation of Akt isoform 1 controls cell survival and thereby the CD95-

mediated apoptotic signal by partitioning CD95 away from the lipid rafts. Nevertheless, we can not rule out the participation of Akt2 in this molecular mechanism. Indeed, EMT is ascribed to the balance between expression level of Akt2 and Akt1 [477], and our analysis of the 60 cell lines from the National Cancer Institute revealed differences in gene expression between type I and type II, which matched to the epithelial-mesenchymal transition [263]. As a consequence, we may envision that the ratio of Akt2 to Akt1 reprograms cells to exclude CD95 from lipid rafts and thus to evade immune surveillance. Akt inh VIII selectively locks the PH domain of Akt-1 and -2 with their respective kinase domain, preventing the activation loop to be phosphorylated by its upstream activator, phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) [470]. On the other hand, Akt inh-X binds the ATP-binding site and abrogates activity of all three isoforms [471]. Expression of the DN-Akt competes with the three endogenous Akt isoforms for the binding to PIP3. Altogether our findings demonstrate that Akt activity is definitively involved in the exclusion of CD95 from the lipid rafts, but hitherto, the Akt isoform acting in this process remains uncertain and will have to be further investigated.

The anti-apoptotic role of Akt is multifaceted. For instance, the serine-threonine kinase abrogates the function of the pro-apoptotic factors caspase-9, Bad and Forkhead family of transcription factor-1 (FKHR1) via their phosphorylation [444, 446, 478]. In addition, by phosphorylating the anti-apoptotic factor PED/PEA-15, Akt dramatically augments its half-life and protects cells from the TRAIL-induced apoptotic signal [447]. The PI3K/Akt signaling pathway also promotes the up-regulation of anti-apoptotic genes such as c-FLIP, which alters the DISC formation and the ignition of the caspase-8 activation [479]. Herein, our results demonstrate that the PI3K/Akt signaling pathway achieves the block of the CD95-mediated apoptotic signal by acting upstream the DISC formation and even upstream the CD95-CD95L interaction through the exclusion of the death receptor from a favorable pro-apoptotic plasma membrane environment.

References

1. Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell* 1995;81:9-12.
2. Montel AH, Bochan MR, Hobbs JA, Lynch DH, Brahmi Z. Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. *Cell Immunol* 1995;166:236-46.
3. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 1995;14:5579-88.
4. Beneteau M, Pizon M, Chaigne-Delalande B, et al. Localization of Fas/CD95 into the Lipid Rafts on Down-Modulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway. *Mol Cancer Res* 2008;6:604-13.
5. Hueber AO, Bernard AM, Herincs Z, Couzinet A, He HT. An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep* 2002;3:190-6.
6. Legembre P, Daburon S, Moreau P, et al. Amplification of Fas-mediated apoptosis in type II cells via microdomain recruitment. *Mol Cell Biol* 2005;25:6811-20.
7. Legembre P, Daburon S, Moreau P, Moreau JF, Taupin JL. Cutting edge: modulation of fas-mediated apoptosis by lipid rafts in T lymphocytes. *J Immunol* 2006;176:716-20.
8. Stel AJ, Ten Cate B, Jacobs S, et al. Fas receptor clustering and involvement of the death receptor pathway in rituximab-mediated apoptosis with concomitant sensitization of lymphoma B cells to fas-induced apoptosis. *J Immunol* 2007;178:2287-95.
9. Delmas D, Rebe C, Lacour S, et al. Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2003;278:41482-90.
10. Delmas D, Rebe C, Micheau O, et al. Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene* 2004;23:8979-86.
11. Gajate C, Mollinedo F. The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* 2001;98:3860-3.
12. Lacour S, Hammann A, Grazide S, et al. Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:3593-8.
13. Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 2003;15:185-93.
14. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 1998;17:1675-87.
15. Jost PJ, Grabow S, Gray D, et al. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* 2009;460:1035-9.
16. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997;388:300-4.
17. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.
18. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000;102:43-53.
19. Peacock JW, Palmer J, Fink D, et al. PTEN loss promotes mitochondrially dependent type II Fas-induced apoptosis via PEA-15. *Mol Cell Biol* 2009;29:1222-34.
20. Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231-41.
21. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997;278:687-9.

22. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998;282:1318-21.
23. Jones RG, Elford AR, Parsons MJ, et al. CD28-dependent activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly. *J Exp Med* 2002;196:335-48.
24. 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.
25. Legembre P, Moreau P, Daburon S, Moreau JF, Taupin JL. Potentiation of Fas-mediated apoptosis by an engineered glycosylphosphatidylinositol-linked Fas. *Cell Death Differ* 2002;9:329-39.
26. Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C, Seed B. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 1998;8:723-32.
27. Calleja V, Laguerre M, Parker PJ, Larijani B. Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition. *PLoS Biol* 2009;7:e17.
28. Thimmaiah KN, Easton JB, Germain GS, et al. Identification of N10-substituted phenoxazines as potent and specific inhibitors of Akt signaling. *J Biol Chem* 2005;280:31924-35.
29. Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-32.
30. Muppidi JR, Siegel RM. Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. *Nat Immunol* 2004;5:182-9.
31. Gingras AC, Kennedy SG, O'Leary MA, Sonenberg N, Hay N. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev* 1998;12:502-13.
32. Aoki M, Blazek E, Vogt PK. A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3k and Akt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:136-41.
33. Algeciras-Schimmich A, Pietras EM, Barnhart BC, et al. Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:11445-50.
34. Hutchinson JN, Jin J, Cardiff RD, Woodgett JR, Muller WJ. Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Res* 2004;64:3171-8.
35. Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, et al. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 2005;171:1023-34.
36. Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinar FF, et al. Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2003;63:196-206.
37. Iliopoulos D, Polytarchou C, Hatzia Apostolou M, et al. MicroRNAs differentially regulated by Akt isoforms control EMT and stem cell renewal in cancer cells. *Sci Signal* 2009;2:ra62.
38. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999;96:857-68.
39. Trencia A, Perfetti A, Cassese A, et al. Protein kinase B/Akt binds and phosphorylates PED/PEA-15, stabilizing its antiapoptotic action. *Mol Cell Biol* 2003;23:4511-21.
40. Panka DJ, Mano T, Suhara T, Walsh K, Mier JW. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *J Biol Chem* 2001;276:6893-6.

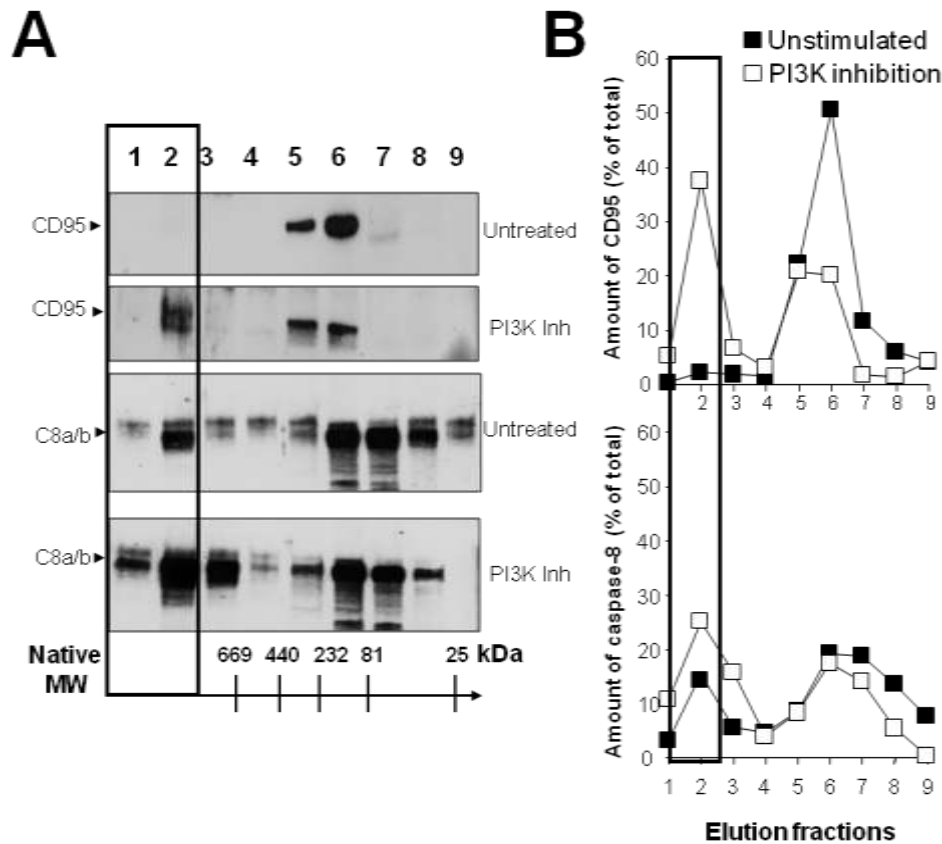


Figure 1. PI3K inhibition leads to the formation of a CD95-containing megaDalton-sized complex and induction of the CD95 signal through a lipid raft-dependent mechanism.

A. In native conditions, proteins were resolved according to their steric hindrance using gel filtration chromatography and the wide range fractionation Superose 6 PC 10/30 column. 96 Fractions were harvested and pooled to obtain 9 samples and then 50 μ l of each fraction was loaded into a 12% SDS-PAGE. Immunoblots were performed using the indicated antibodies. The estimated molecular sizes were depicted below the immunoblots. **B.** For each immunoblot, the band from each fraction was scanned and quantified by densitometry using Image J software and percentage of CD95 (upper panel) or caspase-8 (lower panel) present in each fraction was depicted. **C.** Jurkat cells ($5 \cdot 10^7$ cells) were treated or untreated for 4 h with 5 μ M of wortmannin and then lysed. CD95 was immunoprecipitated and the immune complex was resolved using a SDS-PAGE. Immunoblots with the indicated antibodies were performed. **D.** Jurkat T-cells were incubated for 20 minutes in presence or absence of 2 mM of M β CD then treated for 4 hours with 5 μ M of wortmannin. CD95 was immunoprecipitated and the immune complex was resolved using a SDS-PAGE as described in C. **E.** The Jurkat T-cell line was pre-incubated with 2 mM of M β CD for 20 minutes and then treated for 6 hours with the inhibitors of the PI3K wortmannin or LY294002. Cell death was assessed by measuring the drop of mitochondria potential ($\Delta\Psi_m$). Data depict mean and SD of three independent experiments.

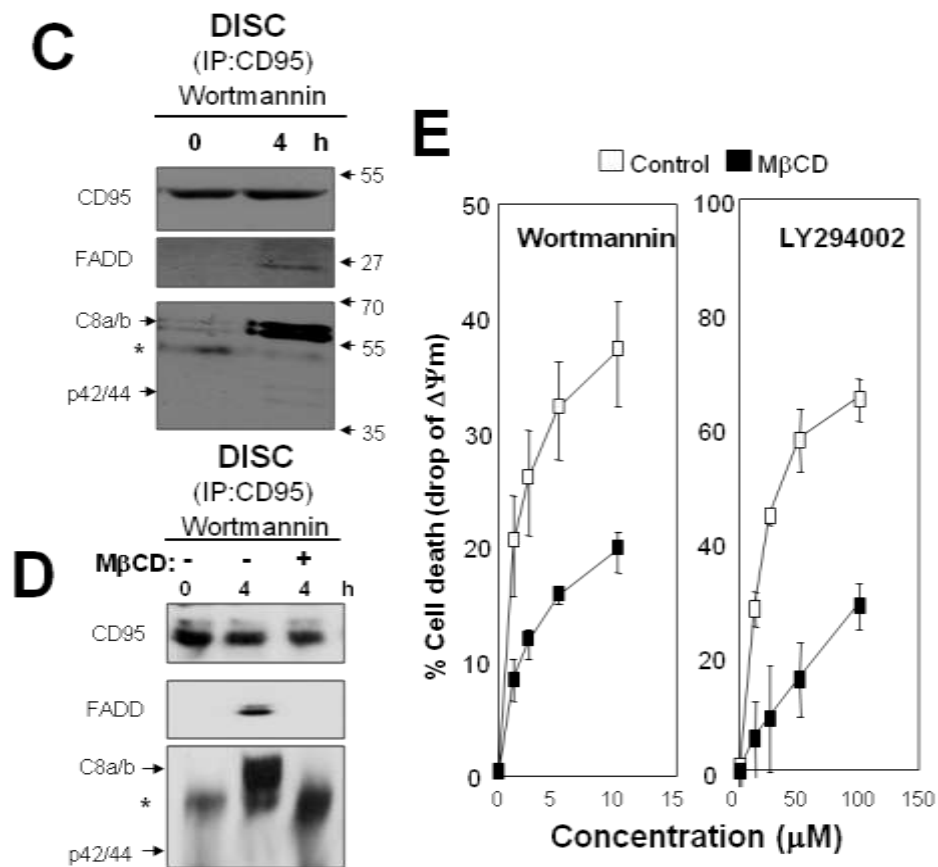


Figure 1. PI3K inhibition leads to the formation of a CD95-containing megaDalton-sized complex and induction of the CD95 signal through a lipid raft-dependent mechanism.

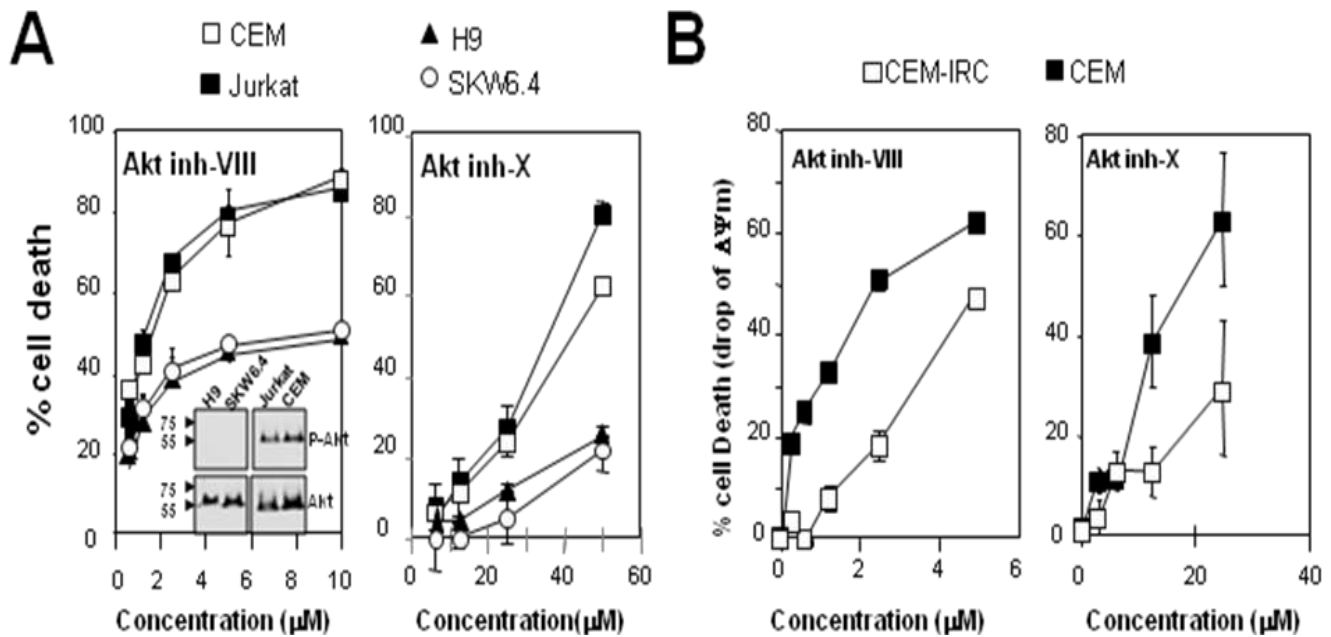


Figure 2. Akt contributes to maintain CD95 outside the lipid rafts.

A. Cells displaying a solid (Jurkat and CEM) or a weak PI3K activity (SKW 6.4 and H9) were treated for 16 hours with the indicated concentrations of Akt inhibitors and cell death was assessed using the viability assay MTT. Inset depicts immunoblots performed with antibodies recognizing either the phosphorylated serine⁴⁷³ of Akt (activated form) or the whole Akt. **B.** CEM-IRC (low CD95) and parental CEM were incubated for 16 hours with the indicated concentration of the selective Akt inhibitors. Percentage of cells exhibiting a drop of their mitochondrial electric potential ($\Delta\Psi\text{m}$) is depicted. **C.** leukemic T-cells Jurkat and CEM were treated or untreated for the indicated times with 5 μM of wortmannin or Akt-inh-VIII. Cells were then lyzed and subjected to SDS-PAGE and anti-caspase-8 immunoblotting. Upon caspase-8 activation, the protease is auto-cleaved and a p43/41 fragment is generated. **D.** Leukemic T-cell lines Jurkat and CEM were incubated for 4 hours with or without 5 μM of the Akt inhibitor VIII. Cells were then fixed and lipid rafts were tagged using Alexa555-B subunit of cholera toxin and CD95 was stained using an anti-CD95 mAb (clone DX2) followed by a FITC-coupled goat anti-mouse mAb. Images were acquired with confocal microscope TSC SP5 (Leica, Wetzlar, Germany, 63x objective). Bars=5 μm . **E.** Leukemic T-cell lines Jurkat and CEM were pre-incubated with or without 2 mM of M β CD and then treated for 6 hours with the indicated concentration of the Akt inh-VIII. Data represent mean and SD of at least three independently performed experiments.

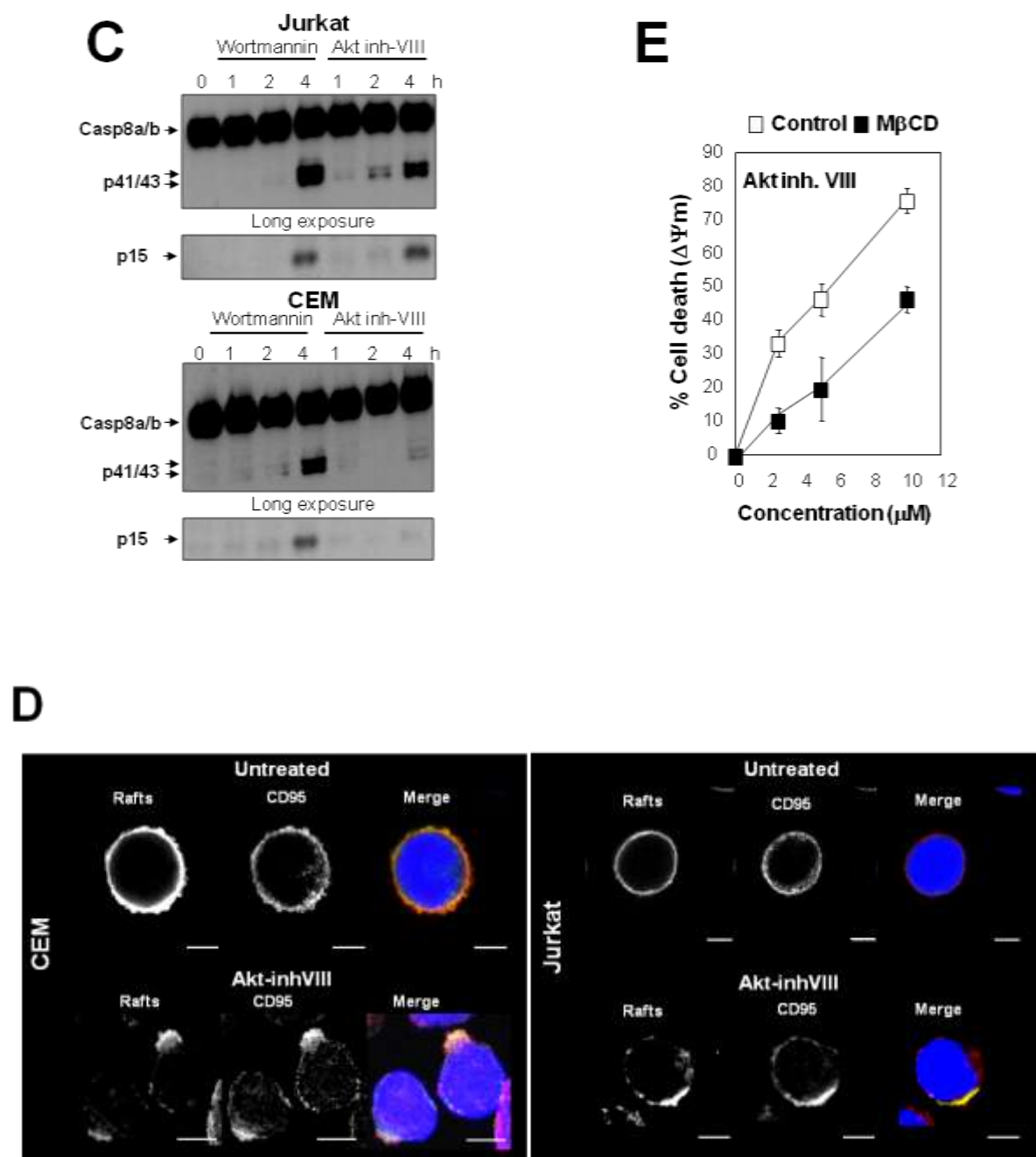


Figure 2. Akt contributes to maintain CD95 outside the lipid rafts.

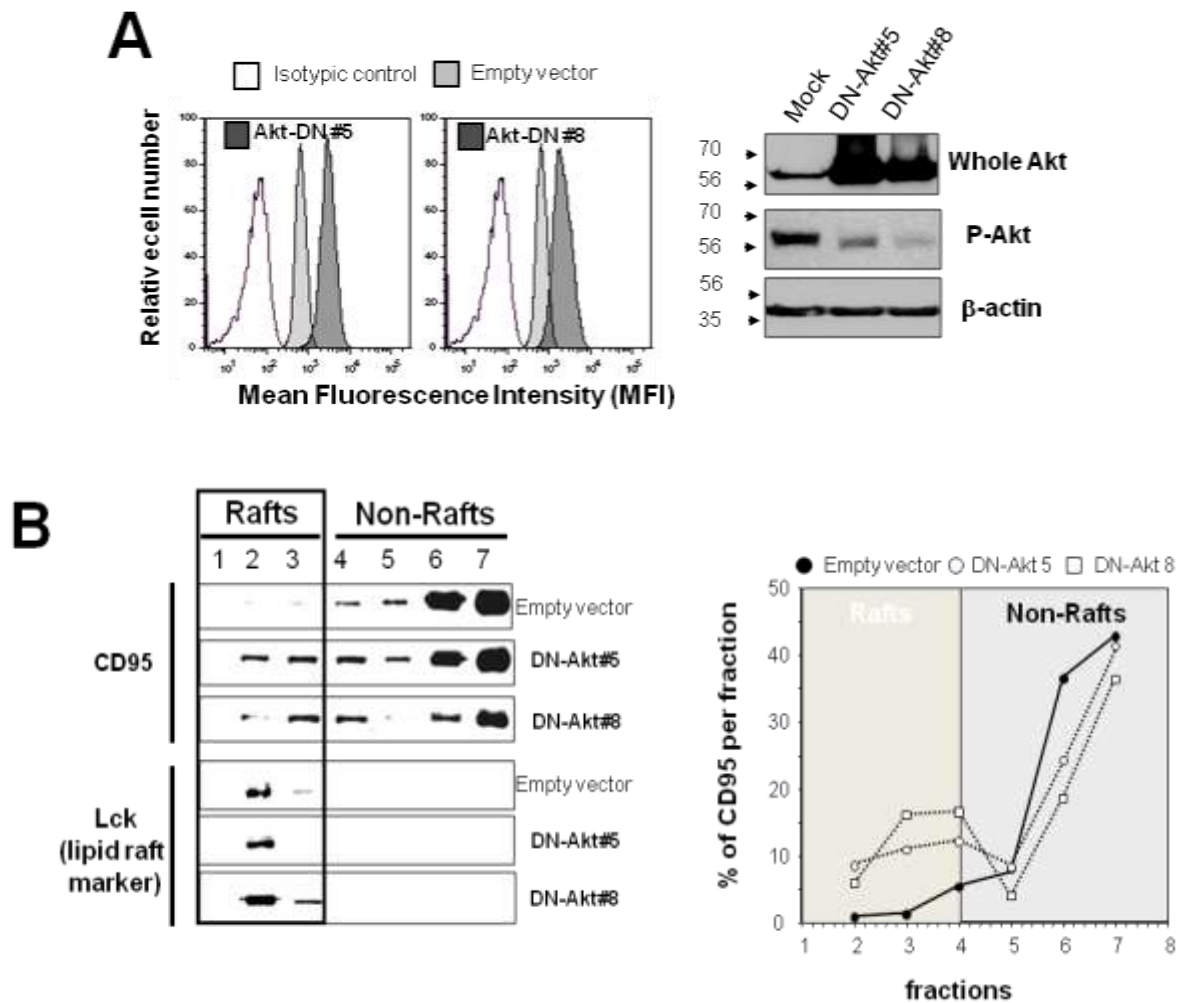


Figure 3. Genetic inhibitor of Akt promotes the DISC formation and the induction of cell death.

A. The dominant negative Akt (DN-Akt) corresponds to the replacement of Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ by alanine. Leukemic T-cell Jurkat was transfected with DN-Akt and two independent clones were isolated and characterized. *left panel*, intracellular staining and flow cytometry analysis of the whole Akt in the DN-Akt-expressing cells and their control counterpart (empty vector). *Right panel*, anti-whole Akt and phosphorylated Akt (Serine⁴⁷³) immunoblots were carried out. β-actin serves as a loading control. **B.** Empty vector and DN-Akt-expressing T-cells ($5 \cdot 10^8$ cells) were lysed. Total lysate was submitted to ultracentrifugation in a discontinuous sucrose gradient to separate low-buoyant density lipid raft fractions from soluble membranes. The src kinase Lck delineates lipid raft fractions. **C.** Indicated cells ($5 \cdot 10^7$ per condition) were incubated with 1 μg/ml of the agonistic antibody APO1-3 for 15 minutes at 4°C (0) or at 37°C (15 minutes). Cells were lysed and CD95 was immunoprecipitated. The associated immune complex was resolved in SDS-PAGE and indicated immunoblots were performed. Total lysate indicates that no alteration of the major DISC components is observed in DN-Akt cells as compared to parental cell line. Data are representative of three independently performed experiments.

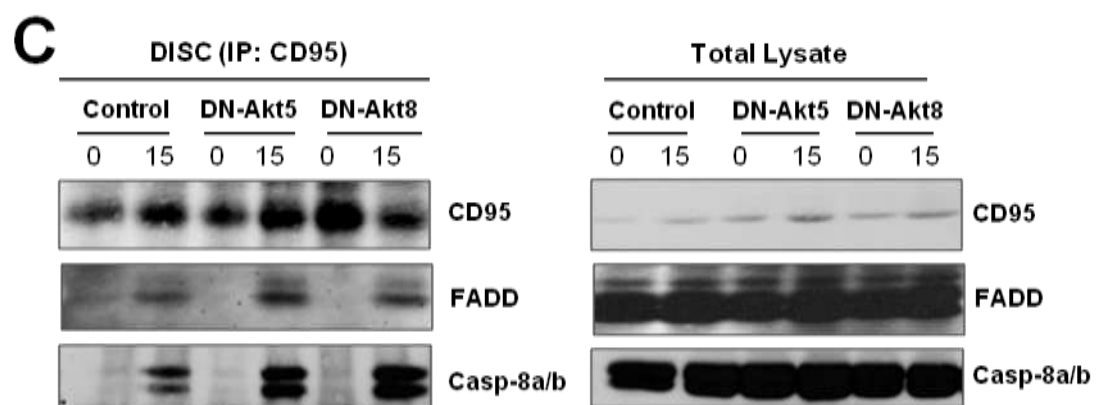


Figure 3. Genetic inhibitor of Akt promotes the DISC formation and the induction of cell death.

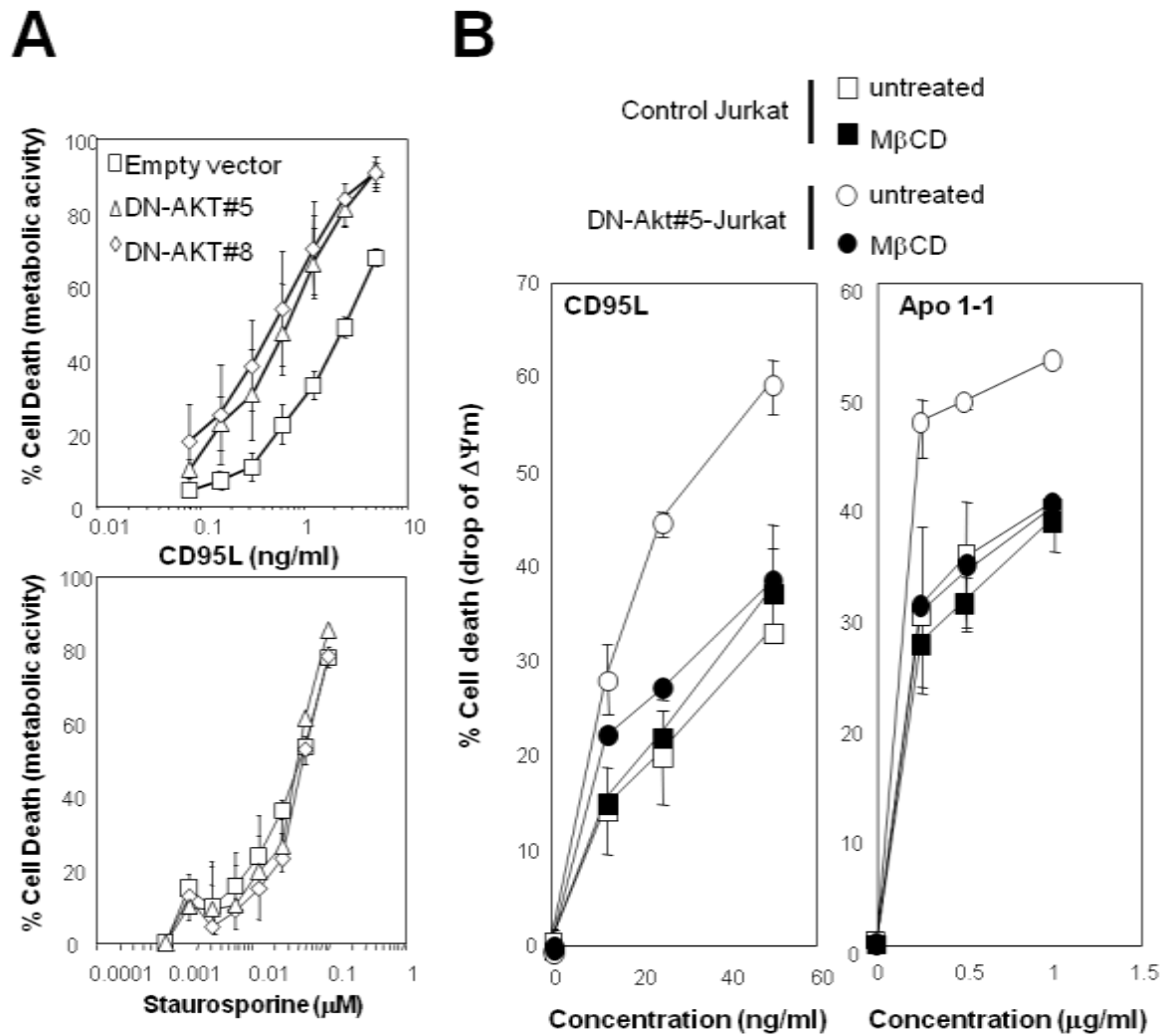


Figure 4. Inhibition of Akt promotes the CD95-mediated apoptotic signal through a lipid raft-dependent mechanism.

A. Empty vector- and DN-Akt-expressing Jurkat cells were treated for 16 hours with the indicated concentrations of either CD95L or mitochondrion-dependent apoptotic inducer staurosporine and cell death was assessed using the viability assay MTT. **B.** and **C.** Control cell line (empty vector-transfected Jurkat cell line) and DN-Akt-expressing Jurkat #5 (**B**) or #8 (**C**) cell lines were pre-incubated with or without 2 mM of MβCD for 20 minutes and then treated for 6 hours with CD95L or the weak CD95 agonist mAb APO1-1. Cell death was assessed by measuring the drop of mitochondria potential ($\Delta\Psi_m$). Data represent mean and SD of three independent experiments.

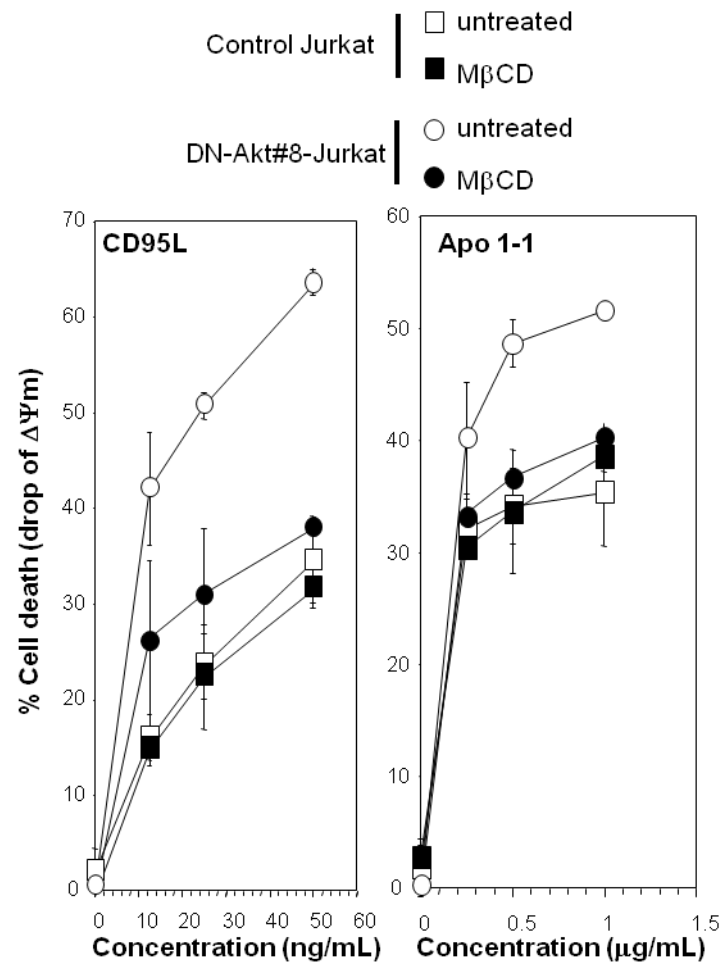
C

Figure 4. Inhibition of Akt promotes the CD95-mediated apoptotic signal through a lipid raft-dependent mechanism.

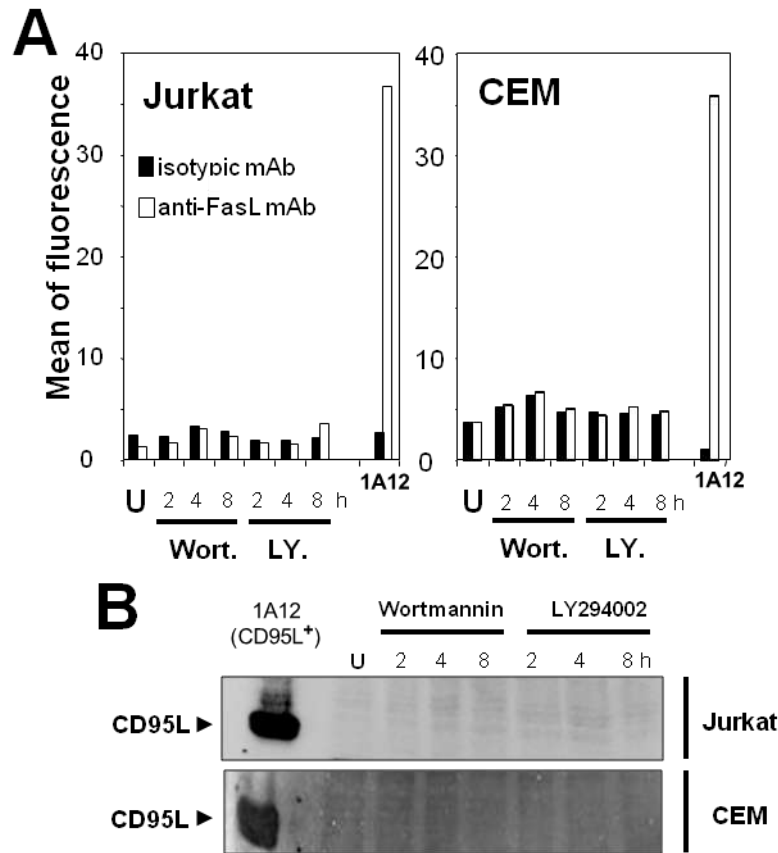


Figure S1. CD95 and CD95L expressions remain unaffected by inhibition of PI3K.

The CD95L-expressing mouse lymphoma cell line 1A12 was kindly provided by Dr Nagata (Osaka, Japan). **A.** Jurkat and CEM cell lines were untreated (U) or treated with wortmannin (10 μ M) or LY294002 (30 μ M) for the indicated times. Cells were washed and CD95L expression was analyzed by flow cytometry using an anti-CD95L mAb (clone 14C2) or an isotypic mAb (anti-LIF mAb clone 1F10). **B.** Cells were treated or untreated with 10 μ M of wortmanin or 30 μ M of LY294002 for indicated times, then cells were lysed and 100 μ g of proteins were resolved in a 12% SDS-PAGE. CD95L expression was detected by immunoblot using an anti-CD95L mAb (clone G247-2, BD biosciences). **C.** Cells were incubated with 5 μ M of Akt Inh VIII or Akt inh X or DMSO (untreated) for 4 hours and CD95L (upper panel) and CD95 (lower panel) plasma membrane expressions were assessed using flow cytometry and specific anti-CD95 mAb (clone DX2) or anti-CD95L mAb (clone 14C2). The isotypic mAb corresponds to the home-made anti-LIF mAb clone 1F10. **D.** Jurkat cells were left untreated or pre-treated with 2 mM of M β CD for 20 min and then incubated for 4 hours with 10 μ M of wortmannin or DMSO (control). CD95 expression was determined by flow cytometry using the anti-CD95 mAb DX2 (BD Biosciences). Isotypic staining corresponds to the anti-LIF mAb (clone 1F10).

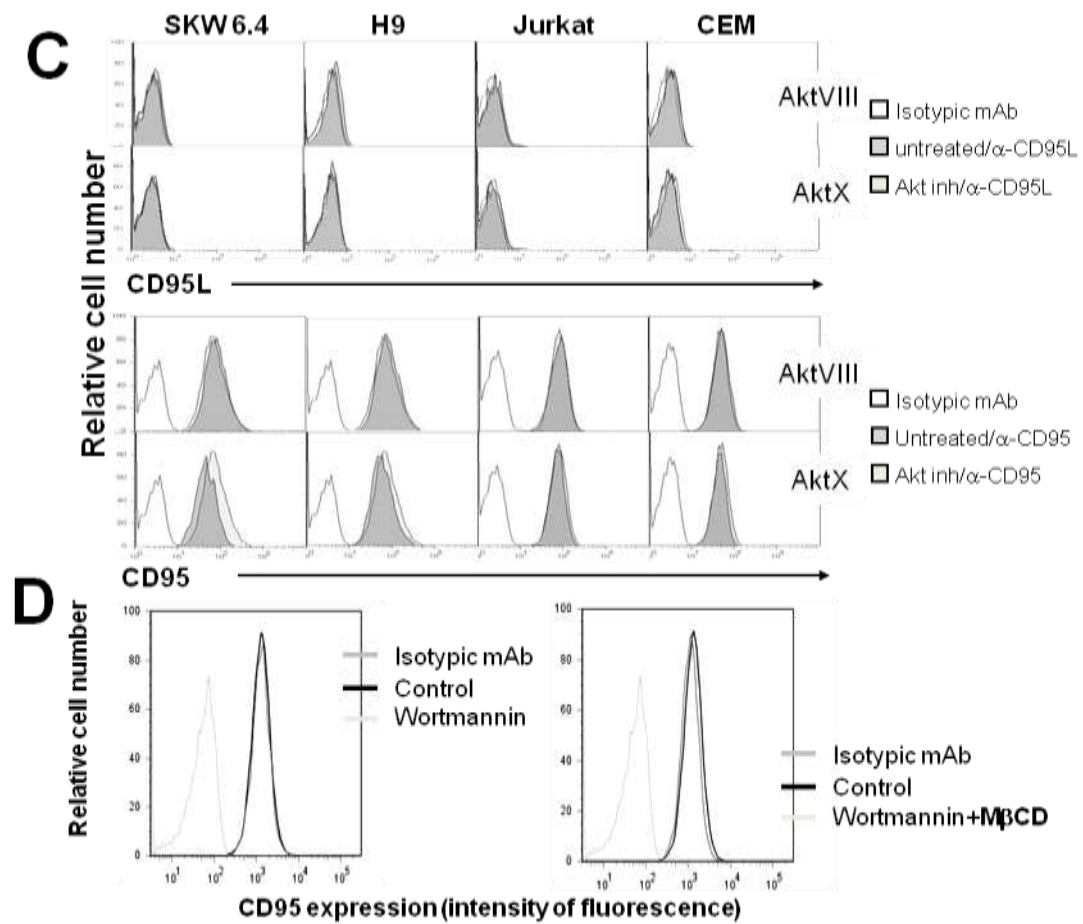


Figure S1. CD95 and CD95L expressions remain unaffected by inhibition of PI3K.

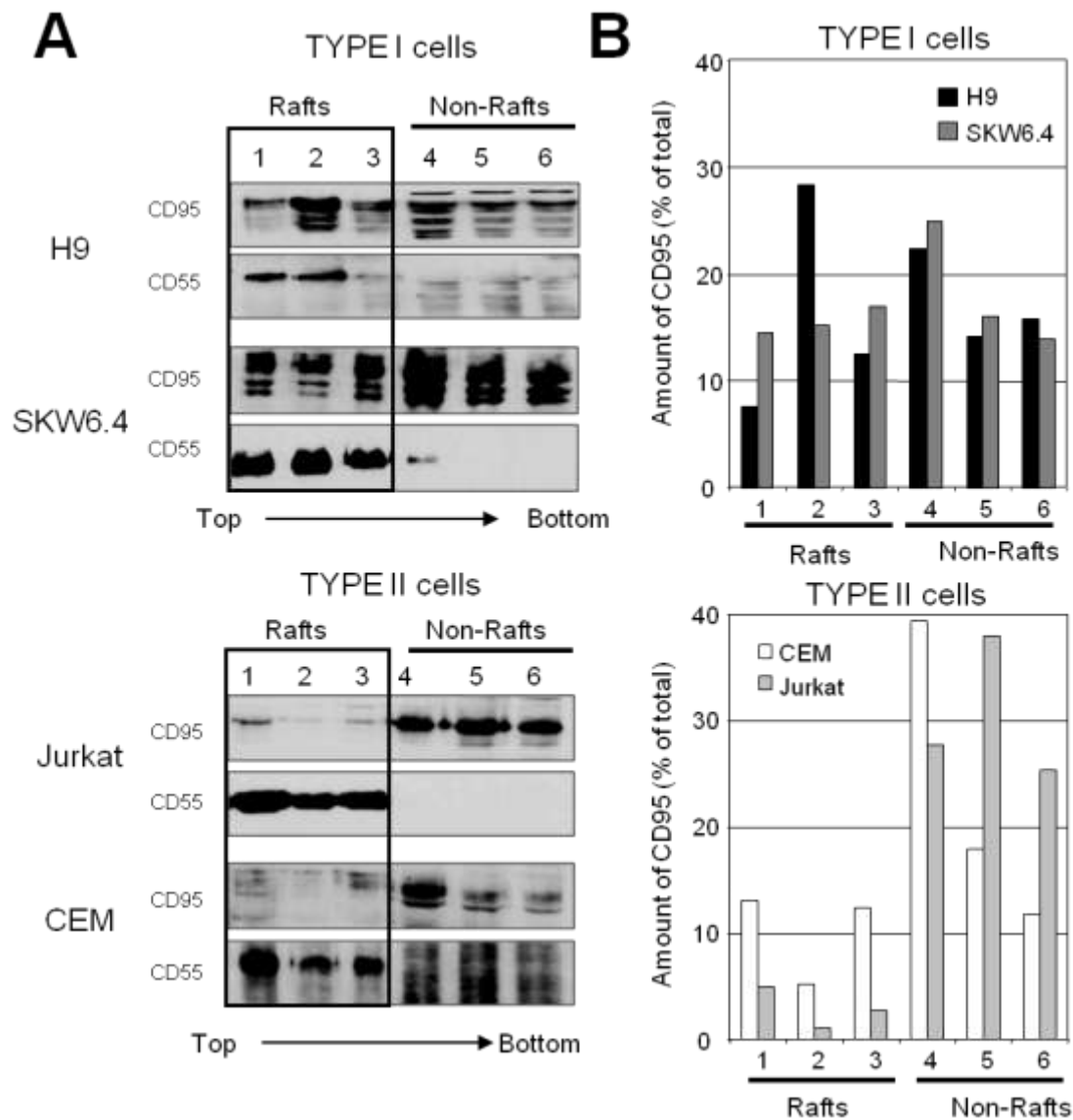


Figure S2. CD95 is found redistributed in detergent resistant microdomains (DRMs) in type I but not in type II cells.

A. Indicated cells (between 10^8 and $2 \cdot 10^8$ cells) were lysed in a non-ionic detergent (Triton X-100)-containing lysis buffer and lipid rafts were isolated from the rest of the plasma membrane upon ultracentrifugation in a sucrose gradient. Fractions 1-3 stand for lipid rafts, while fractions 4-6 contains the non-raft membranes. **B.** The

distribution of CD95 on the immunoblots depicted in A was quantified by densitometry analysis using ImageJ software.

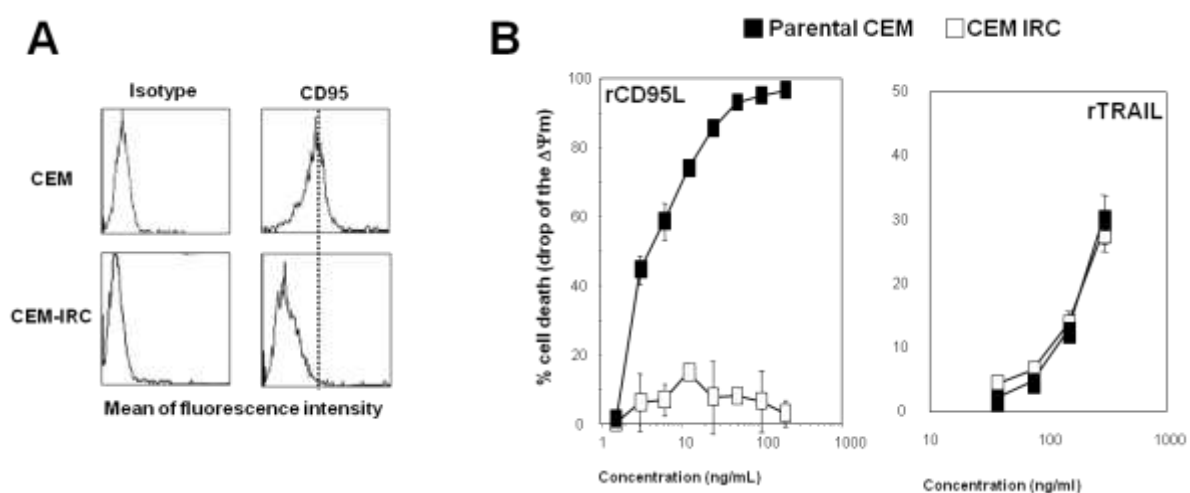


Figure S3. Low CD95-expressing cell line CEM displays no alteration of the death receptor signaling pathway.

A. Parental and Ig-CD95L-resistant CEM (CEM-IRC) cell lines were incubated for 30 minutes with 5 μ g/ml of isotypic mAb (anti-LIF, clone 1F10) or 5 μ g/ml of the anti-CD95 mAb (clone DX2). Cells were washed and cell binding of the primary antibody was revealed using a goat anti-mouse FITC-conjugated secondary mAb. Cells were next washed and their intensity of fluorescence was assessed by flow cytometry. **B.** The leukemic T-cell line CEM-IRC and its parental counterpart CEM were treated for 8 hours with the indicated concentration of CD95L or TRAIL and cell death was quantified by assessing the drop of the mitochondrial potential. While the CD95-mediated apoptotic signal is dramatically altered due to the down-regulation of plasma membrane CD95, the death signaling pathway remains unaltered upon addition of TRAIL indicating that except a down-modulation of the death receptor CD95, cell death machinery remains unaltered in the CEM-IRC cell line, as compared to the parental CEM.

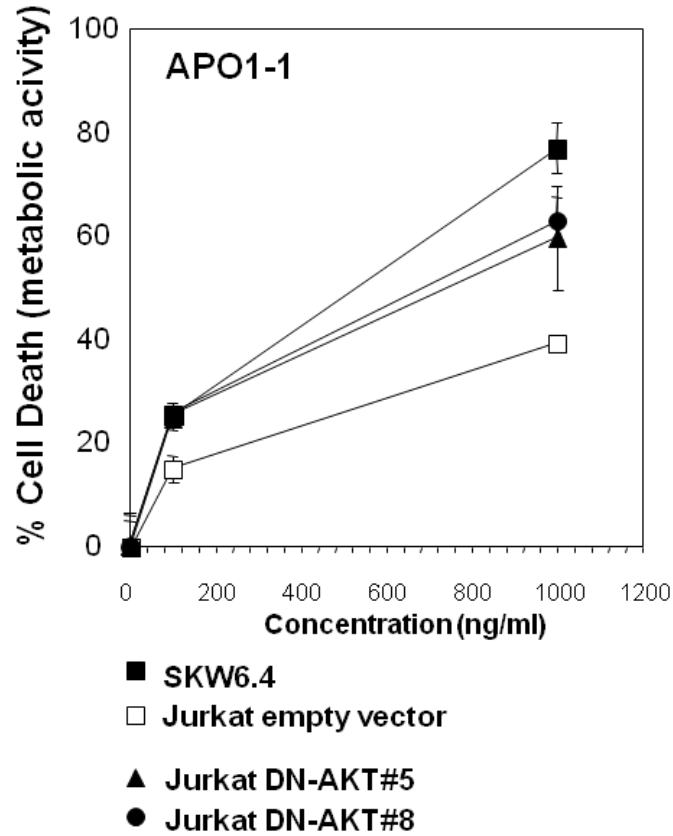


Figure S4. Akt-DN expression modifies the APO1-1-mediated type II response to a type I-like one.

The type I cell line SKW6.4 and the type II cells Jurkat and Akt-DN-expressing Jurkat clones #5 and #8 were incubated with CD95-expressing CEM T-cell line and its counterpart CEM were treated for 8 hours with the indicated concentration of CD95L or TRAIL and cell death was quantified by assessing the drop of the mitochondrial potential. While the CD95-mediated apoptotic signal is dramatically altered due to the down-regulation of plasma membrane CD95, the death signaling pathway remains unaltered upon addition of TRAIL.

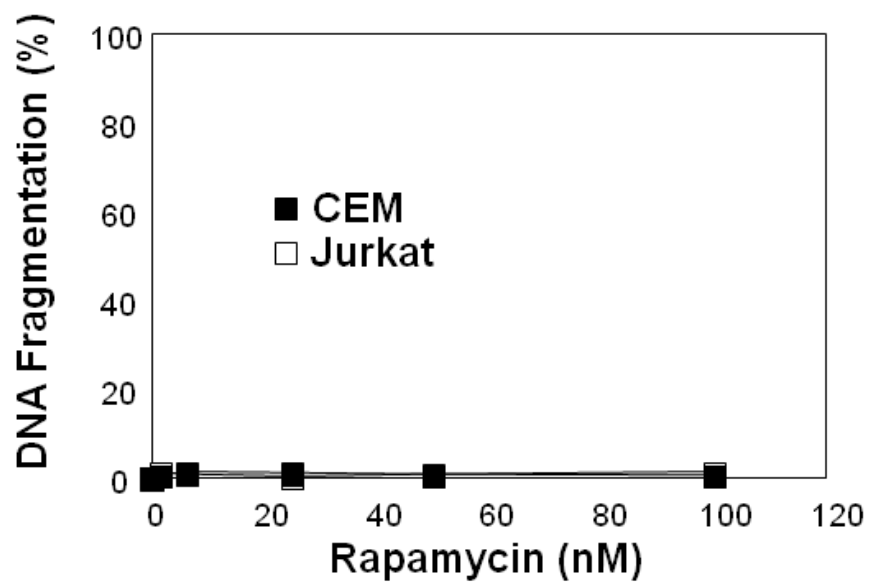


Figure S5. In contrast to PI3K class Ia or Akt, inhibition of mTOR does not trigger apoptosis in leukemic T-cells.

The leukemic T-cells CEM and Jurkat were treated with the indicated concentrations of the mTOR inhibitor Rapamycin and cell death was assessed by measuring the percentage of sub-G1 cells (DNA fragmented cells).

3) Principaux résultats

1) *Le signal PI3K contrôle la distribution membranaire de CD95*

Dans l'étude précédente, nous avons montré que la voie PI3K jouait un rôle dans le maintien de CD95 en dehors des microdomaines [462]. Ici, nous étudions si cette inhibition de la PI3K permet la formation du DISC et l'induction d'un signal apoptotique dépendant de la redistribution du récepteur dans les radeaux lipidiques. Comme le montre les figures 1A et 1B, l'inhibition de la PI3K dans les Jurkat induit la formation de complexes moléculaires de l'ordre du mégadalton, contenant à la fois CD95 et la caspase-8. Afin de déterminer si l'inhibition de la PI3K induit l'étape initiale du signal CD95, la formation du DISC, nous avons ensuite immunoprécipité CD95 dans les Jurkat suite à un traitement à la wortmannine et au LY294002. Nous avons observé que l'inhibition de la PI3K induit l'association de CD95 avec FADD, et le recrutement de la caspase-8 (Figure 1C). Cette formation du DISC est indépendante de CD95L, puisque l'on n'observe aucune trace de CD95L, que ce soit avant ou après traitement avec les inhibiteurs (Figure S1A et B).

Nous avons ensuite étudié le rôle des radeaux lipidiques dans la formation du DISC et dans le signal apoptotique lors de l'inhibition de la PI3K. Nous montrons que les microdomaines sont nécessaires à la formation du DISC et au signal apoptotique induit par l'inhibition de la PI3K (Figure 1D et 1E).

Ainsi, l'inhibition de la PI3K induit la formation d'agrégats de CD95, la formation du DISC, et l'induction d'un signal apoptotique dépendant des microdomaines mais indépendamment du CD95L.

2) *L'inhibition d'Akt permet la redistribution de CD95 dans les microdomaines et induit un signal apoptotique médié par CD95.*

Comme la protéine Akt est un effecteur de la voie PI3K, et joue un rôle anti-apoptotique vis-à-vis du signal CD95, nous avons étudié si Akt était capable de contrôler la distribution de CD95 à la membrane.

L'utilisation d'inhibiteurs d'Akt, à savoir l'Akt inhibiteur VIII, qui est un inhibiteur des isoformes 1 et 2 d'Akt, et l'Akt inhibiteur X, qui inhibe les trois isoformes, induit un signal apoptotique de façon préférentielle dans les types II comparativement aux types I (Figure 2A). Comme le montre la figure 2B, la résistance au signal CD95 induit également une résistance à la mort induite par les inhibiteurs d'Akt. La figure 2C met en évidence que de manière similaire aux inhibiteurs de PI3K, l'inhibition d'Akt active la caspase initiateur -8.

En conclusion, l'inhibition d'Akt induit un signal apoptotique médié par CD95. Tout comme l'inhibition de la PI3K, l'inhibition d'Akt n'induit ni l'expression de CD95L ni la sur-expression de CD95 (Figure S1C). L'étude par imagerie des cellules de type II traitées avec les inhibiteurs d'Akt révèle la formation de CD95-CAP et la redistribution du récepteur de mort dans les microdomaines (Figure 1D). De plus, l'utilisation de la M β CD prévient le signal apoptotique induit lors de l'inhibition d'Akt (Figure 1E). En conséquence, l'inhibition de l'activité kinase d'Akt favorise l'agrégation de CD95, sa relocalisation dans les microdomaines, et le déclenchement d'un signal apoptotique.

Afin de confirmer le rôle d'Akt dans la distribution membranaire de CD95, nous avons généré des Jurkat exprimant un dominant négatif d'Akt (DN-Akt). Comme le montre la figure 3A, deux clones ont été obtenus exprimant de façon stable le DN-Akt, et cette expression inhibe bien la phosphorylation d'Akt. L'inhibition de l'activité Akt dans les Jurkat DN-Akt, induit un enrichissement significatif de CD95 dans les radeaux lipidiques, contrairement aux cellules parentales (Figure 3B).

Contrairement aux inhibiteurs chimiques, cette redistribution de CD95 n'induit pas un signal apoptotique. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que l'inhibition d'Akt dans les Jurkat DN-Akt n'est pas totale, impliquant une activité anti-apoptotique résiduelle. Cependant, nous observons que l'enrichissement de CD95 dans les radeaux lipidiques, facilite

la formation du DISC et la transmission du signal apoptotique dans les Jurkat DN-Akt. La lignée Jurkat étant une cellule de type II, nous avons vérifié que l'expression du DN-Akt n'altérerait pas la voie apoptotique mitochondriale. Au contraire du signal CD95, le signal apoptotique induit par la staurosporine, un inducteur de la voie apoptotique mitochondriale, n'est pas modifié entre les Jurkat DN-Akt et les parents (Figure 4A). Ces résultats indiquent que le signal Akt interagit avec CD95 en amont du signal mitochondrial.

CD95 étant enrichi dans les microdomaines chez les Jurkat DN-Akt, nous avons ensuite étudié le rôle de ces radeaux lipidiques dans cette sensibilisation au signal CD95. Les Jurkat DN-Akt et les cellules parentales, ont été incubées avec la M β CD, puis traitées avec le CD95L ou un anticorps agoniste l'Apo 1-1. Nous n'avons observé aucune différence de sensibilité des Jurkat parentales avec ou sans traitement avec la M β CD, ce qui est en accord avec l'absence de CD95 dans les microdomaines de ces cellules. A l'inverse, l'amplification du signal de mort chez les Jurkat DN-Akt est inhibée après traitement avec la M β CD (Figure 4B et 4C). L'Apo1-1 a précédemment été utilisé pour discriminer les cellules de type I et les cellules de type II. En effet, les cellules de type I sont sensibles à cet anticorps, à l'inverse des cellules de type II, et cette sensibilité est dépendante de la présence de CD95 dans les microdomaines [128]. Il est à noter que la sensibilité des Jurkat à l'Apo1-1 suite à l'inhibition d'Akt, est proche de celle de cellules de type I. Ainsi, l'inhibition d'Akt dans les Jurkat DN-Akt sensibilise ces cellules au signal CD95, et cela de façon dépendante des microdomaines

4) Conclusions

Ainsi, au cours de cette étude nous avons montré que la voie PI3K/Akt est capable d'inhiber les étapes initiales du signal CD95, en agissant en amont de la formation du DISC ou de l'interaction CD95/CD95L, en maintenant CD95 exclu des microdomaines.

DISCUSSION GENERALE

Au cours de nos études, nous avons montré que l'inhibition de la voie PI3K/Akt induit un signal apoptotique via la redistribution de CD95 dans les radeaux lipidiques.

De façon intéressante, nous avons observé des différences importantes vis-à-vis de l'activité de la voie PI3K/Akt entre les lignées leucémiques. En effet, pendant que les lignées de type I présentent une faible phosphorylation d'Akt, à l'inverse, les lignées de type II arborent une activité PI3K forte. Les différences entre type I et type II font l'objet de plusieurs études, on notera principalement que les deux types divergent dans leur capacité à former un DISC de manière efficace, et dans leur dépendance vis-à-vis de la mitochondrie lors du signal apoptotique. En 2004, Muppidi et Siegel ont montré que dans les cellules de type II, le CD95 est exclu des microdomaines, alors que dans les cellules de type I, il y est colocalisé [128]. Ils ont également observé que des lymphocytes activés se comportent comme des cellules de type II, alors que la restimulation de ces lymphocytes entraîne une relocalisation de CD95 dans les radeaux lipidiques, et le passage vers un type I. Contrairement aux cellules de type II, les cellules de type I possèdent une sensibilité exacerbée vis-à-vis du signal de mort induit par un faible agoniste du CD95, l'Apo 1-1. Nous avons montré que l'inhibition de la voie PI3K/Akt dans nos lignées leucémiques de type II via nos mutants DN-Akt entraîne i) une relocalisation de CD95 dans ces radeaux lipidiques, ii) une formation plus efficace du DISC lors de la stimulation de CD95 et iii) une sensibilisation à l'anticorps agoniste Apo1-1 dépendante de l'intégrité des radeaux lipidiques. Nous avons également observé que la stimulation des lymphocytes s'accompagne d'une activation de la PI3K/Akt, alors que leur restimulation inhibe cette voie (Bénéteau M, Legembre P, data non publiées). Il existe donc une corrélation entre une activité forte de la voie PI3K/Akt et l'orientation de la cellule vers un phénotype type II. Cette hypothèse est appuyée par des études récentes, mais aucune d'elles n'avaient jusqu'à alors impliqué les microdomaines : en effet, Peacock et ses collaborateurs ont démontré que la phosphorylation de PED/PEA-15 par la voie PI3K/Akt, bloque la formation du DISC dans les cellules de type I et oriente vers un signal type II dépendant de la mitochondrie [306]. L'analyse transcriptomique de nombreuses lignées tumorales montre que les cellules de type I présentent majoritairement des marqueurs génétiques de type mésenchymateux, alors que les cellules de types II présentent les caractéristiques génétiques de cellules épithéliales. Cette étude suggère que lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), les cellules transiteraient d'un type II vers un type I. Récemment, la protéine Akt a été impliquée dans l'EMT et plus précisément la balance entre son isoforme

1 et 2 [431, 477]. Dans le but de confirmer notre hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'activité PI3K/Akt dans ces différentes lignées, afin de déterminer si cette voie joue un rôle dans la discrimination type I/type II. De plus, la transfection de Bcl-2 dans nos cellules de type II exprimant le DN-Akt, nous permettrait de déterminer l'indépendance de nos cellules vis-à-vis de la mitochondrie lors du signal apoptotique CD95, et donc le passage « complet » vers un type I.

Le contrôle de la transition entre type II et type I est très prometteur en cancérologie, car la relocalisation du CD95 dans les microdomaines est connue pour amplifier le signal apoptotique médié par ce récepteur, et nous avons de plus montré que cette relocalisation peut entraîner un signal de mort dépendant du CD95 et des microdomaines, mais indépendamment du CD95L. Ce phénomène a déjà été observé au cours de traitement avec des agents anticancéreux tel que l'edelfosine, mais les mécanismes moléculaires responsables de ce signal de mort sont inconnus. Nous avons, à notre connaissance, été les premiers à avoir apporté un élément de réponse, en montrant que l'inhibition de la voie PI3K/Akt est capable de reproduire ces phénomènes, sachant que l'edelfosine inhibe cette voie.

La voie PI3K/Akt, qui est activée dans de nombreux cancers, est un des mécanismes anti-apoptotiques employés par les tumeurs afin de résister à la mort. En effet, elle joue un rôle important dans la résistance à l'apoptose, notamment en inhibant le signal apoptotique CD95. Cette inhibition touche différents niveaux de ce signal de mort, à la fois au niveau du DISC via l'expression de c-FLIP, mais également à un niveau plus basal, avec les phosphorylations de Bad ou de la caspase-9. Nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme anti-apoptotique de la voie PI3K/Akt vis-à-vis du signal CD95, qui se situe en amont de la formation du DISC, via le contrôle de la distribution de ce récepteur à la membrane.

Le maintien de CD95 en dehors des microdomaines par la voie PI3K/Akt, pourrait impliquer le cytosquelette. En effet, la PI3K, ainsi que la protéine Akt, agissent sur le remodelage du cytosquelette [480-483], mais sont également responsables d'interactions entre la membrane et le cytosquelette [484]. De plus, la relocalisation de protéines dans les microdomaines de manière polarisée a déjà été observée dans la formation de la synapse immunologique [329], et implique l'actine ainsi que la protéine ezrine [485]. L'ezrine appartient à la famille des ERM (Ezrine/Radixine/Moesine), et est une molécule de pontage reliant l'actine à certains récepteurs transmembranaires. Il a été décrit une interaction entre

l'eitrine, l'actine et CD95 [486]. La voie PI3K/Akt interagit également avec l'eitrine, via la fixation de la sous-unité régulatrice de la PI3K, la p85, sur le domaine de l'eitrine dont la Tyr³⁵³ est phosphorylée [487]. De plus, Akt semble capable d'activer l'eitrine via la phosphorylation de la Thr⁵⁶⁷ [488] et cette activation de l'eitrine est sous la dépendance de sa fixation aux PIP₂ [489], qui sont présents dans les radeaux lipidiques [490-492]. L'une des hypothèses est que la voie PI3K/Akt joue un rôle sur la localisation du CD95 via l'eitrine. Des mutants de l'eitrine ont été réalisés au laboratoire : un mutant dont le domaine de fixation à CD95 a été éliminé, et un autre dont le domaine de fixation à l'actine est tronqué. Ces mutants inhibent de manière compétitive la fixation de l'eitrine endogène aux récepteurs membranaires. L'expression de ces mutants avec ou sans inhibiteurs de la voie PI3K/Akt dans nos lignées de type II, nous renseignera sur l'implication de l'eitrine dans la distribution de CD95 à la membrane plasmique. Le rôle du cytosquelette devra également être déterminé. L'inhibition du cytosquelette via des inhibiteurs chimiques (Cytochalasin D, et Latrunculin A) suite à l'inhibition de la voie PI3K/Akt, nous permettra d'apprécier son rôle dans les différents phénomènes observés. Cependant, nous avons récemment démontré que l'inhibition du cytosquelette dans les cellules de type II au repos, ne perturbe pas la relocalisation du récepteur CD95 dans les radeaux lipidiques lors de l'ajout de CD95L [168]. Le rôle du cytosquelette d'actine dans le contexte de l'inhibition de la voie PI3K/Akt reste à étudier.

D'autres mécanismes indépendants du cytosquelette, ont été décrits comme étant responsables de la relocalisation de protéines dans les radeaux lipidiques, et c'est notamment le cas de modifications post-traductionnelles que sont la myristoylation et la palmitoylation. En effet, les protéines Lck et Fyn, qui appartiennent à la famille des Src kinases (SFKs), sont myristoylées, et palmitoylées. Ces modifications lipidiques permettent l'adressage de ces protéines dans les radeaux lipidiques [493]. De plus, la palmitoylation seule est capable de relocaliser les protéines dans les microdomaines et peut être réversible [494] à l'inverse de la myristoylation. Le ratio entre les PATs (*protéines acyltransferases*) qui permettent le transfert d'un acide palmitique sur une cystéine, et les APTs (*acylprotein thioesterase*) qui induisent la dépalmitoylation, permet la régulation de l'expression à la membrane des protéines. Il est à noter, que les protéines peuvent également « s'auto-acyler » en présence d'une forte concentration en palmitoyl-CoA. Cho et ses collaborateurs ont montré que la surexpression de PPT1, qui appartient à la famille des APTs, entraîne une résistance à la mort induite par un inhibiteur de la PI3K (LY294002), et le C₂-ceramide [495]. Nous savons que ces deux inducteurs de mort déclenchent un signal apoptotique CD95 [268, 269, 462]. De plus, les

cellules sur-exprimant PPT1 arborent une forte activité de la voie PI3K/Akt [495]. On peut ainsi imaginer que la voie PI3K/Akt maintient CD95 en dehors des microdomaines via la régulation de sa palmitoylation. Le prétraitement de nos lignées de type II avec du 2-BrPA (2-*bromopalmitic*), qui est un inhibiteur de la palmitoylation, nous permettrait de connaître l'éventuel rôle de la palmitoylation du CD95 dans sa relocalisation dans les microdomaines suite à l'inhibition de la voie PI3K/Akt. L'état de palmitoylation du CD95 peut également être apprécié via un marquage métabolique au [³H]palmitate de nos cellules, une immunoprécipitation de CD95, puis un western blot avec un marquage autoradiographique.

La modification de la fluidité membranaire pourrait être un autre mécanisme dans la relocalisation de CD95 dans les microdomaines. La production de céramides a également été impliquée dans la relocalisation de CD95 dans les radeaux lipidiques. En effet, le cisplatine (*cis-dicholorodiamine-platinum*), qui est un agent cancéreux, induit la relocalisation de CD95 dans les microdomaines [461], via l'activation de la sphingomyelinase acide (aSMase) et la génération de céramide à la membrane [496]. De plus, cette génération de céramide à la membrane entraîne une augmentation de la fluidité membranaire [496], qui est responsable de la formation d'agrégats de radeaux lipidiques [497]. Cette fluidité membranaire induite par le cisplatine semble due à son action inhibitrice sur la protéine NHE1 (*Na⁺ /H⁺ exchanger isoforme 1*) [496] qui entraîne une acidification du cytosol et ainsi active la sphingomyelinase acide et la production de céramides. L'augmentation de la fluidité membranaire est indispensable à la formation d'agrégats de radeaux lipidiques [497] et favorise la redistribution de CD95 dans les microdomaines. Des travaux récents mettent en évidence que la kinase Akt phosphoryle et active NHE1 [498]. L'édelfosine inhibe la voie PI3K et ce lipide entraîne également une augmentation de la fluidité membranaire [499]. Il est également important de noter que le traitement des cellules avec un analogue des céramides, le C₂-céramide, induit une inhibition de la protéine Akt1. L'utilisation d'inhibiteur de NHE1, comme l'EIPA (5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl)amiloride) ou la cariporide, ainsi que l'étude de sa phosphorylation lors de l'inhibition de la voie PI3K/Akt, nous permettrait d'apprécier son rôle dans la relocalisation de CD95 dans les microdomaines. En conclusion, l'inhibition de la voie PI3K/Akt pourrait induire l'activation de l'aSMase, responsable de la production de céramide, permettant une fluidification de la membrane, entraînant la formation de larges plateformes de radeaux lipidiques et une relocalisation de la protéine CD95 dans ces radeaux.

Nous avons pu observer, via une étude microscopique, que cette relocalisation du CD95 dans les microdomaines, s'accompagnent de la mise en place d'un « cluster » de CD95 ainsi que d'un « patch » de radeaux lipidiques à un pôle de la cellule. Ce « CD95-CAP » est similaire à ceux observés suite à la stimulation du CD95 par son ligand [168, 170], et nous avons confirmé, par une approche biochimique (gel filtration), la présence de CD95 et de la caspase-8 dans des complexes de haut poids moléculaire suite à l'inhibition de PI3K/Akt. Ceci semble indiquer que la formation du DISC que l'on observe lors de l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt se déroule dans ce « cluster » de radeaux lipidiques concentrant CD95. L'immunoprécipitation du CD95 dans ces fractions de haut poids moléculaires nous permettrait d'apprécier la formation du DISC dans ces complexes. De plus, seule une partie des microdomaines se relocalise pour former ce « patch » de radeaux lipidiques. Ce phénomène laisse présager l'existence de fonctions dédiées à certains microdomaines, ce qui tend à confirmer l'hypothèse de notre précédente étude [180].

Nos travaux ont également confirmé un rôle important des microdomaines dans la formation du DISC au cours de l'inhibition de la voie PI3K/Akt, ainsi que dans le signal apoptotique qui en découle.

L'amplification du signal CD95 pourrait être médiée par la composition protéique de ces microdomaines, et la protéine Lck serait un bon candidat. En effet, en 1996, le Dr Schlottman et son équipe ont montré que suite à la stimulation du CD95, les src-kinases Lck et Fyn sont phosphorylées [500]. Plus récemment, l'équipe du Dr Sharif-Askari a mis en évidence la participation de la tyrosine kinase Lck dans la formation du DISC lors de la stimulation du CD95 [501]. Or il est connu que la protéine Lck est localisée dans les radeaux lipidiques [502]. L'analyse du signal de mort dans les Jurkat JCam-1.6 déficientes pour la protéine Lck [503] et reconstituées avec la forme sauvage, en présence d'inhibiteurs de la voie PI3K/Akt, permettrait de définir le rôle de la protéine Lck i) dans la relocalisation de CD95 dans les microdomaines, ii) la formation du DISC et iii) le signal de mort. Une étude protéomique, après immunoprécipitation du DISC (via la protéine CD95) dans les fractions enrichies en radeaux lipidiques (obtenues après ultracentrifugation en gradient discontinu de saccharose), nous permettrait de connaître les différents protagonistes concentrés dans les radeaux lipidiques et participant à l'amplification du signal apoptotique suite à l'inhibition de la voie PI3K/Akt.

La nature lipidique des microdomaines pourrait également être responsable de cette amplification du signal CD95. Riedl et son équipe ont démontré que le CD95 existe sous une forme fermée, qui est stable et majoritaire, et une forme ouverte qui serait instable mais indispensable à la transmission du signal de mort [40]. Cette ouverture de la protéine CD95 de façon stable serait due à la proximité de ces molécules dans un espace restreint, et à des interactions faibles entre leur domaine de mort. Les radeaux lipidiques sont des zones de la membrane qui sont compactes, connues pour concentrer les protéines qui y sont séquestrées, et où la diffusion par rapport au reste de la membrane est diminuée. Ainsi, lorsque les molécules de CD95 sont localisées dans ces radeaux lipidiques, la concentration de ce récepteur de mort dans un espace restreint pourrait faciliter l'ouverture de l'hélice α 6 du domaine de mort et permettre le recrutement de FADD, puis la formation du DISC, tout comme le fait le CD95L ou les anticorps agonistes. On peut alors imaginer, qu'en plus de concentrer le CD95, la diffusion réduite des protéines ainsi que la rigidité observée dans ces microdomaines, pourraient favoriser la stabilisation de la forme ouverte du CD95 et donc le signal de mort qui en découle.

L'utilisation d'inhibiteurs de la voie de signalisation PI3K comme thérapie anti-cancéreuse s'avère encore trop toxique pour l'organisme car cette kinase contribue à de multiples fonctions comme la prolifération, la migration, la croissance cellulaire [504]. Ainsi, nous pensons que la caractérisation fine des mécanismes moléculaires responsables de la relocalisation de CD95 dans les microdomaines, suite à l'inhibition de la voie PI3K/Akt, permettrait de définir des cibles thérapeutiques, afin de resensibiliser les cellules tumorales au système immunitaire en évitant l'inhibition de PI3K ou Akt, tous deux impliqués dans de nombreux processus cellulaires, et donc potentiellement essentiels pour des cellules non-tumorales.

.

BIBLIOGRAPHIE

1. Melino, G., *The Sirens' song*. Nature, 2001. **412**(6842): p. 23.
2. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
3. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell Death Differ, 2009. **16**(1): p. 3-11.
4. Horvitz, H.R., *Genetic control of programmed cell death in the nematode Caenorhabditis elegans*. Cancer Res, 1999. **59**(7 Suppl): p. 1701s-1706s.
5. Kinchen, J.M. and M.O. Hengartner, *Tales of cannibalism, suicide, and murder: Programmed cell death in C. elegans*. Curr Top Dev Biol, 2005. **65**: p. 1-45.
6. Merino, R., et al., *Bone morphogenetic proteins regulate interdigital cell death in the avian embryo*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **887**: p. 120-32.
7. Nijhawan, D., N. Honarpour, and X. Wang, *Apoptosis in neural development and disease*. Annu Rev Neurosci, 2000. **23**: p. 73-87.
8. Tilly, J.L., et al., *Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression*. Endocrinology, 1991. **129**(5): p. 2799-801.
9. Rozzo, S.J., et al., *Development of the T cell receptor repertoire in lpr mice*. Semin Immunol, 1994. **6**(1): p. 19-26.
10. Kishimoto, H., C.D. Surh, and J. Sprent, *A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo*. J Exp Med, 1998. **187**(9): p. 1427-38.
11. Bouillet, P., et al., *BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes*. Nature, 2002. **415**(6874): p. 922-6.
12. Liu, Y.J., *Reuse of B lymphocytes in germinal centers*. Science, 1997. **278**(5336): p. 238-9.
13. Brunner, T., et al., *Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology*. Semin Immunol, 2003. **15**(3): p. 167-76.
14. Vaux, D.L., S. Cory, and J.M. Adams, *Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells*. Nature, 1988. **335**(6189): p. 440-2.
15. Festjens, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, *Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(9-10): p. 1371-87.
16. Golstein, P. and G. Kroemer, *Cell death by necrosis: towards a molecular definition*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(1): p. 37-43.
17. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
18. Camerini, D., et al., *The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family*. J Immunol, 1991. **147**(9): p. 3165-9.
19. Durkop, H., et al., *Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease*. Cell, 1992. **68**(3): p. 421-7.
20. Stamenkovic, I., E.A. Clark, and B. Seed, *A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas*. EMBO J, 1989. **8**(5): p. 1403-10.
21. Itoh, N., et al., *The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis*. Cell, 1991. **66**(2): p. 233-43.
22. Loetscher, H., et al., *Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor*. Cell, 1990. **61**(2): p. 351-9.
23. Schall, T.J., et al., *Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor*. Cell, 1990. **61**(2): p. 361-70.
24. Chinnaiyan, A.M., et al., *Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95*. Science, 1996. **274**(5289): p. 990-2.
25. Kitson, J., et al., *A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis*. Nature, 1996. **384**(6607): p. 372-5.
26. Chaudhary, P.M., et al., *Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 821-30.

27. Pan, G., et al., *Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor*. FEBS Lett, 1998. **431**(3): p. 351-6.
28. Marsters, S.A., et al., *A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain*. Curr Biol, 1997. **7**(12): p. 1003-6.
29. Sheridan, J.P., et al., *Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors*. Science, 1997. **277**(5327): p. 818-21.
30. Lichter, P., et al., *The human APO-1 (APT) antigen maps to 10q23, a region that is syntenic with mouse chromosome 19*. Genomics, 1992. **14**(1): p. 179-80.
31. Cheng, J., et al., *Characterization of human Fas gene. Exon/intron organization and promoter region*. J Immunol, 1995. **154**(3): p. 1239-45.
32. Siegel, R.M., et al., *Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2354-7.
33. Itoh, N. and S. Nagata, *A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen*. J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 10932-7.
34. Tartaglia, L.A., et al., *A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death*. Cell, 1993. **74**(5): p. 845-53.
35. Orlinick, J.R., et al., *Requirement of cysteine-rich repeats of the Fas receptor for binding by the Fas ligand*. J Biol Chem, 1997. **272**(46): p. 28889-94.
36. Starling, G.C., et al., *Identification of amino acid residues important for ligand binding to Fas*. J Exp Med, 1997. **185**(8): p. 1487-92.
37. Chan, F.K., et al., *A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2351-4.
38. Papoff, G., et al., *Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 38241-50.
39. Kischkel, F.C., et al., *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. EMBO J, 1995. **14**(22): p. 5579-88.
40. Scott, F.L., et al., *The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering*. Nature, 2009. **457**(7232): p. 1019-22.
41. Boldin, M.P., et al., *A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain*. J Biol Chem, 1995. **270**(14): p. 7795-8.
42. Chinnaiyan, A.M., et al., *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis*. Cell, 1995. **81**(4): p. 505-12.
43. Yanagisawa, J., et al., *The molecular interaction of Fas and FAP-1. A tripeptide blocker of human Fas interaction with FAP-1 promotes Fas-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8539-45.
44. Mundle, S.D. and A. Raza, *Defining the dynamics of self-assembled Fas-receptor activation*. Trends Immunol, 2002. **23**(4): p. 187-94.
45. Ivanov, V.N., et al., *FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(10): p. 3623-35.
46. Debatin, K.M., et al., *High expression of APO-1 (CD95) on T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children*. Blood, 1994. **83**(10): p. 3101-3.
47. Falk, M.H., et al., *Expression of the APO-1 antigen in Burkitt lymphoma cell lines correlates with a shift towards a lymphoblastoid phenotype*. Blood, 1992. **79**(12): p. 3300-6.
48. Kobayashi, N., et al., *Anti-Fas monoclonal antibody is cytotoxic to human immunodeficiency virus-infected cells without augmenting viral replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(24): p. 9620-4.
49. Leithauser, F., et al., *Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells*. Lab Invest, 1993. **69**(4): p. 415-29.
50. Stahnke, K., et al., *CD95 (APO-1/FAS)-mediated apoptosis in cytokine-activated hematopoietic cells*. Exp Hematol, 1998. **26**(9): p. 844-50.
51. Jenkins, M., M. Keir, and J.M. McCune, *A membrane-bound Fas decoy receptor expressed by human thymocytes*. J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 7988-93.
52. Papoff, G., et al., *An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4622-30.
53. Cascino, I., et al., *Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 13-7.
54. Cascino, I., et al., *Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing*. J Immunol, 1995. **154**(6): p. 2706-13.

55. Knipping, E., et al., *Levels of soluble Fas/APO-1/CD95 in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(12): p. 1735-7.
56. Alderson, M.R., et al., *Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 71-7.
57. Thome, M. and J. Tschopp, *Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 50-8.
58. Kirchhoff, S., et al., *Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(10): p. 2765-74.
59. Boussiotis, V.A., et al., *Induction of T cell clonal anergy results in resistance, whereas CD28-mediated costimulation primes for susceptibility to Fas- and Bax-mediated programmed cell death*. J Immunol, 1997. **159**(7): p. 3156-67.
60. Holmstrom, T.H., et al., *MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly*. EMBO J, 2000. **19**(20): p. 5418-28.
61. Vignaux, F. and P. Golstein, *Fas-based lymphocyte-mediated cytotoxicity against syngeneic activated lymphocytes: a regulatory pathway?* Eur J Immunol, 1994. **24**(4): p. 923-7.
62. Mohamood, A.S., et al., *Fas-mediated apoptosis regulates the composition of peripheral alphabeta T cell repertoire by constitutively purging out double negative T cells*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3465.
63. Watanabe-Fukunaga, R., et al., *Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis*. Nature, 1992. **356**(6367): p. 314-7.
64. Rathmell, J.C., et al., *CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells*. Nature, 1995. **376**(6536): p. 181-4.
65. Takahashi, Y., H. Ohta, and T. Takemori, *Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire*. Immunity, 2001. **14**(2): p. 181-92.
66. Hennino, A., et al., *FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis*. J Exp Med, 2001. **193**(4): p. 447-58.
67. Kennedy, N.J., et al., *Caspase activation is required for T cell proliferation*. J Exp Med, 1999. **190**(12): p. 1891-6.
68. Alam, A., et al., *Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells*. J Exp Med, 1999. **190**(12): p. 1879-90.
69. Strauss, G., et al., *CD95 co-stimulation blocks activation of naive T cells by inhibiting T cell receptor signaling*. J Exp Med, 2009. **206**(6): p. 1379-93.
70. Guo, Z., et al., *Fas ligation induces IL-1beta-dependent maturation and IL-1beta-independent survival of dendritic cells: different roles of ERK and NF-kappaB signaling pathways*. Blood, 2003. **102**(13): p. 4441-7.
71. Corsini, N.S., et al., *The death receptor CD95 activates adult neural stem cells for working memory formation and brain repair*. Cell Stem Cell, 2009. **5**(2): p. 178-90.
72. Desbarats, J., et al., *Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(2): p. 118-25.
73. Barnhart, B.C., et al., *CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells*. EMBO J, 2004. **23**(15): p. 3175-85.
74. Chen, L., et al., *CD95 promotes tumour growth*. Nature. **465**(7297): p. 492-6.
75. Peter, M.E., P. Legembre, and B.C. Barnhart, *Does CD95 have tumor promoting activities?* Biochim Biophys Acta, 2005. **1755**(1): p. 25-36.
76. Galle, P.R., et al., *Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1223-30.
77. Ni, R., et al., *Fas-mediated apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes*. Exp Cell Res, 1994. **215**(2): p. 332-7.
78. Muschen, M., et al., *Regulation of CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand expression by lipopolysaccharide and dexamethasone in parenchymal and nonparenchymal rat liver cells*. Hepatology, 1998. **27**(1): p. 200-8.
79. Sodeman, T., et al., *Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **278**(6): p. G992-9.
80. Adachi, M., et al., *Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver*. Nat Genet, 1995. **11**(3): p. 294-300.
81. Desbarats, J. and M.K. Newell, *Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy*. Nat Med, 2000. **6**(8): p. 920-3.
82. Ogasawara, J., et al., *Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice*. Nature, 1993. **364**(6440): p. 806-9.

83. Kondo, T., et al., *Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis*. Nat Med, 1997. **3**(4): p. 409-13.
84. Takahashi, T., et al., *Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity*. Int Immunol, 1994. **6**(10): p. 1567-74.
85. Suda, T., et al., *Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family*. Cell, 1993. **75**(6): p. 1169-78.
86. Takahashi, T., et al., *Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand*. Cell, 1994. **76**(6): p. 969-76.
87. Schneider, P., et al., *Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18827-33.
88. Orlinick, J.R., K.B. Elkon, and M.V. Chao, *Separate domains of the human fas ligand dictate self-association and receptor binding*. J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 32221-9.
89. Wenzel, J., et al., *Multiple interactions of the cytosolic polyproline region of the CD95 ligand: hints for the reverse signal transduction capacity of a death factor*. FEBS Lett, 2001. **509**(2): p. 255-62.
90. Mariani, S.M., et al., *Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases*. Eur J Immunol, 1995. **25**(8): p. 2303-7.
91. Matsuno, H., et al., *Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand*. J Rheumatol, 2001. **28**(1): p. 22-8.
92. Mitsiades, N., et al., *Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity*. Cancer Res, 2001. **61**(2): p. 577-81.
93. Kiaei, M., et al., *Matrix metalloproteinase-9 regulates TNF-alpha and FasL expression in neuronal, glial cells and its absence extends life in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. Exp Neurol, 2007. **205**(1): p. 74-81.
94. Schulte, M., et al., *ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death*. Cell Death Differ, 2007. **14**(5): p. 1040-9.
95. Kirkin, V., et al., *The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells*. Cell Death Differ, 2007. **14**(9): p. 1678-87.
96. Tanaka, M., et al., *Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes*. EMBO J, 1995. **14**(6): p. 1129-35.
97. Schneider, P., et al., *Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity*. J Exp Med, 1998. **187**(8): p. 1205-13.
98. Shudo, K., et al., *The membrane-bound but not the soluble form of human Fas ligand is responsible for its inflammatory activity*. Eur J Immunol, 2001. **31**(8): p. 2504-11.
99. Suda, T., et al., *Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing*. J Exp Med, 1997. **186**(12): p. 2045-50.
100. Tanaka, M., et al., *Downregulation of Fas ligand by shedding*. Nat Med, 1998. **4**(1): p. 31-6.
101. Aoki, K., et al., *Extracellular matrix interacts with soluble CD95L: retention and enhancement of cytotoxicity*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 333-7.
102. Ottonello, L., et al., *Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3601-6.
103. Seino, K., et al., *Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes*. J Immunol, 1998. **161**(9): p. 4484-8.
104. Martinez-Lorenzo, M.J., et al., *Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1274-81.
105. Griffith, T.S., et al., *Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege*. Science, 1995. **270**(5239): p. 1189-92.
106. Badley, A.D., et al., *Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes*. J Virol, 1996. **70**(1): p. 199-206.
107. Westendorp, M.O., et al., *Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120*. Nature, 1995. **375**(6531): p. 497-500.
108. Raftery, M.J., et al., *Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy*. Immunity, 2001. **15**(6): p. 997-1009.
109. Kagi, D., et al., *Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity*. Science, 1994. **265**(5171): p. 528-30.
110. Lowin, B., et al., *Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways*. Nature, 1994. **370**(6491): p. 650-2.

111. Nagata, S. and P. Golstein, *The Fas death factor*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1449-56.
112. Stranges, P.B., et al., *Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity*. Immunity, 2007. **26**(5): p. 629-41.
113. Hildeman, D.A., et al., *Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 759-67.
114. Ferguson, T.A., D.R. Green, and T.S. Griffith, *Cell death and immune privilege*. Int Rev Immunol, 2002. **21**(2-3): p. 153-72.
115. Stuart, P.M., et al., *CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival*. J Clin Invest, 1997. **99**(3): p. 396-402.
116. O'Connell, J., et al., *The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 1075-82.
117. Strand, S., et al., *Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion?* Nat Med, 1996. **2**(12): p. 1361-6.
118. Hahne, M., et al., *Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape*. Science, 1996. **274**(5291): p. 1363-6.
119. Bennett, M.W., et al., *The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma*. J Immunol, 1998. **160**(11): p. 5669-75.
120. Maher, S., et al., *Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack*. Immunol Cell Biol, 2002. **80**(2): p. 131-7.
121. Chen, J.J., Y. Sun, and G.J. Nabel, *Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L)*. Science, 1998. **282**(5394): p. 1714-7.
122. Seino, K., et al., *Antitumor effect of locally produced CD95 ligand*. Nat Med, 1997. **3**(2): p. 165-70.
123. Kang, S.M., et al., *Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 738-43.
124. Takeuchi, T., et al., *Accelerated rejection of Fas ligand-expressing heart grafts*. J Immunol, 1999. **162**(1): p. 518-22.
125. Robertson, M.J., et al., *Functional consequences of APO-1/Fas (CD95) antigen expression by normal and neoplastic hematopoietic cells*. Leuk Lymphoma, 1995. **17**(1-2): p. 51-61.
126. Yonehara, S., A. Ishii, and M. Yonehara, *A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor*. J Exp Med, 1989. **169**(5): p. 1747-56.
127. Trauth, B.C., et al., *Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis*. Science, 1989. **245**(4915): p. 301-5.
128. Muppidi, J.R. and R.M. Siegel, *Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death*. Nat Immunol, 2004. **5**(2): p. 182-9.
129. Shiraishi, T., et al., *Increased cytotoxicity of soluble Fas ligand by fusing isoleucine zipper motif*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(1): p. 197-202.
130. Holler, N., et al., *Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(4): p. 1428-40.
131. Greaney, P., et al., *A Fas agonist induces high levels of apoptosis in haematological malignancies*. Leuk Res, 2006. **30**(4): p. 415-26.
132. Voisin, M.B., et al., *Separate functions for the two modules of the membrane-proximal cytokine binding domain of glycoprotein 190, the leukemia inhibitory factor low affinity receptor, in ligand binding and receptor activation*. J Biol Chem, 2002. **277**(16): p. 13682-92.
133. Nagata, S. and T. Suda, *Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations*. Immunol Today, 1995. **16**(1): p. 39-43.
134. Wu, J., et al., *Autoimmune disease in mice due to integration of an endogenous retrovirus in an apoptosis gene*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 461-8.
135. Adachi, M., R. Watanabe-Fukunaga, and S. Nagata, *Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1756-60.
136. Kobayashi, S., et al., *Transcriptional repression and differential splicing of Fas mRNA by early transposon (ETn) insertion in autoimmune lpr mice*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **191**(2): p. 617-24.
137. Moroy, T., et al., *Expression of a Pim-1 transgene accelerates lymphoproliferation and inhibits apoptosis in lpr/lpr mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10734-8.

138. Matsuzawa, A., et al., *A new allele of the lpr locus, lprcg, that complements the gld gene in induction of lymphadenopathy in the mouse.* J Exp Med, 1990. **171**(2): p. 519-31.
139. Rao, V.K. and S.E. Straus, *Causes and consequences of the autoimmune lymphoproliferative syndrome.* Hematology, 2006. **11**(1): p. 15-23.
140. Canale, V.C. and C.H. Smith, *Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma.* J Pediatr, 1967. **70**(6): p. 891-9.
141. Fisher, G.H., et al., *Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome.* Cell, 1995. **81**(6): p. 935-46.
142. Holzelova, E., et al., *Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations.* N Engl J Med, 2004. **351**(14): p. 1409-18.
143. Eberstadt, M., et al., *The lymphoproliferation mutation in Fas locally unfolds the Fas death domain.* Nat Struct Biol, 1997. **4**(12): p. 983-5.
144. Kasahara, Y., et al., *Novel Fas (CD95/APO-1) mutations in infants with a lymphoproliferative disorder.* Int Immunol, 1998. **10**(2): p. 195-202.
145. Rieux-Laucat, F., et al., *Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity.* Science, 1995. **268**(5215): p. 1347-9.
146. van der Burg, M., et al., *Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in a child from consanguineous parents: a dominant or recessive disease?* Pediatr Res, 2000. **47**(3): p. 336-43.
147. Straus, S.E., et al., *The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis.* Blood, 2001. **98**(1): p. 194-200.
148. Infante, A.J., et al., *The clinical spectrum in a large kindred with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a Fas mutation that impairs lymphocyte apoptosis.* J Pediatr, 1998. **133**(5): p. 629-33.
149. Rieux-Laucat, F., et al., *Lymphoproliferative syndrome with autoimmunity: A possible genetic basis for dominant expression of the clinical manifestations.* Blood, 1999. **94**(8): p. 2575-82.
150. Chiocchetti, A., et al., *High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation.* Blood, 2004. **103**(4): p. 1376-82.
151. Wu, J., et al., *Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease.* J Clin Invest, 1996. **98**(5): p. 1107-13.
152. Poppema, S., E. Maggio, and A. van den Berg, *Development of lymphoma in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) and its relationship to Fas gene mutations.* Leuk Lymphoma, 2004. **45**(3): p. 423-31.
153. Muschen, M., et al., *The origin of CD95-gene mutations in B-cell lymphoma.* Trends Immunol, 2002. **23**(2): p. 75-80.
154. Beltinger, C., et al., *CD95 (APO-1/Fas) mutations in childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia.* Blood, 1998. **91**(10): p. 3943-51.
155. Tamiya, S., et al., *Mutation of CD95 (Fas/Apo-1) gene in adult T-cell leukemia cells.* Blood, 1998. **91**(10): p. 3935-42.
156. Takayama, H., et al., *Fas gene mutations in prostatic intraepithelial neoplasia and concurrent carcinoma: analysis of laser capture microdissected specimens.* Lab Invest, 2001. **81**(3): p. 283-8.
157. Lee, S.H., et al., *Alterations of Fas (APO-1/CD95) gene in transitional cell carcinomas of urinary bladder.* Cancer Res, 1999. **59**(13): p. 3068-72.
158. Lee, S.H., et al., *Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in non-small cell lung cancer.* Oncogene, 1999. **18**(25): p. 3754-60.
159. Park, W.S., et al., *Somatic mutations in the death domain of the Fas (Apo-1/CD95) gene in gastric cancer.* J Pathol, 2001. **193**(2): p. 162-8.
160. Shin, M.S., et al., *Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma.* Am J Pathol, 1999. **154**(6): p. 1785-91.
161. Muschen, M., U. Warskulat, and M.W. Beckmann, *Defining CD95 as a tumor suppressor gene.* J Mol Med, 2000. **78**(6): p. 312-25.
162. Stassi, G., et al., *Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus.* J Exp Med, 1997. **186**(8): p. 1193-200.
163. De Maria, R. and R. Testi, *Fas-FasL interactions: a common pathogenetic mechanism in organ-specific autoimmunity.* Immunol Today, 1998. **19**(3): p. 121-5.
164. Giordano, C., et al., *Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis.* Science, 1997. **275**(5302): p. 960-3.

165. Kanemitsu, S., et al., *A functional polymorphism in fas (CD95/APO-1) gene promoter associated with systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2002. **29**(6): p. 1183-8.
166. Lee, Y.H., et al., *Fas promoter -670 polymorphism is associated with development of anti-RNP antibodies in systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2001. **28**(9): p. 2008-11.
167. Horiuchi, T., et al., *Association of Fas/APO-1 gene polymorphism with systemic lupus erythematosus in Japanese*. Rheumatology (Oxford), 1999. **38**(6): p. 516-20.
168. Chaigne-Delalande, B., et al., *CD95 engagement mediates actin-independent and -dependent apoptotic signals*. Cell Death Differ, 2009. **16**(12): p. 1654-64.
169. Hueber, A.O., et al., *An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes*. EMBO Rep, 2002. **3**(2): p. 190-6.
170. Siegel, R.M., et al., *SPOTS: signaling protein oligomeric transduction structures are early mediators of death receptor-induced apoptosis at the plasma membrane*. J Cell Biol, 2004. **167**(4): p. 735-44.
171. Salvesen, G.S. and V.M. Dixit, *Caspase activation: the induced-proximity model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 10964-7.
172. Shi, Y., *Caspase activation: revisiting the induced proximity model*. Cell, 2004. **117**(7): p. 855-8.
173. Lavrik, I.N., et al., *CD95 stimulation results in the formation of a novel death effector domain protein-containing complex*. J Biol Chem, 2008. **283**(39): p. 26401-8.
174. Brenner, B., et al., *Fas/CD95/Apo-I activates the acidic sphingomyelinase via caspases*. Cell Death Differ, 1998. **5**(1): p. 29-37.
175. Cremesti, A., et al., *Ceramide enables fas to cap and kill*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 23954-61.
176. Grassme, H., et al., *Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation*. Oncogene, 2003. **22**(35): p. 5457-70.
177. Lee, K.H., et al., *The role of receptor internalization in CD95 signaling*. EMBO J, 2006. **25**(5): p. 1009-23.
178. Chakrabandhu, K., et al., *Palmitoylation is required for efficient Fas cell death signaling*. EMBO J, 2007. **26**(1): p. 209-20.
179. Feig, C., et al., *Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling*. EMBO J, 2007. **26**(1): p. 221-31.
180. Legembre, P., et al., *Amplification of Fas-mediated apoptosis in type II cells via microdomain recruitment*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(15): p. 6811-20.
181. Legembre, P., et al., *Modulation of Fas-mediated apoptosis by lipid rafts in T lymphocytes*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 716-20.
182. Ho, P.K. and C.J. Hawkins, *Mammalian initiator apoptotic caspases*. FEBS J, 2005. **272**(21): p. 5436-53.
183. Philchenkov, A., *Caspases: potential targets for regulating cell death*. J Cell Mol Med, 2004. **8**(4): p. 432-44.
184. Lamkanfi, M., M. Kalai, and P. Vandenabeele, *Caspase-12: an overview*. Cell Death Differ, 2004. **11**(4): p. 365-8.
185. Lippens, S., et al., *Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing*. Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1218-24.
186. Van de Craen, M., et al., *Identification of a new caspase homologue: caspase-14*. Cell Death Differ, 1998. **5**(10): p. 838-46.
187. Stennicke, H.R., et al., *Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8*. J Biol Chem, 1998. **273**(42): p. 27084-90.
188. Thornberry, N.A., et al., *A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(29): p. 17907-11.
189. Walker, N.P., et al., *Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer*. Cell, 1994. **78**(2): p. 343-52.
190. Wilson, K.P., et al., *Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme*. Nature, 1994. **370**(6487): p. 270-5.
191. Muzio, M., 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**(6): p. 817-27.
192. Scaffidi, C., et al., *FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b*. J Biol Chem, 1997. **272**(43): p. 26953-8.
193. Horiuchi, T., et al., *Dominant expression of a novel splice variant of caspase-8 in human peripheral blood lymphocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **272**(3): p. 877-81.
194. Hoffmann, J.C., et al., *A new C-terminal cleavage product of procaspase-8, p30, defines an alternative pathway of procaspase-8 activation*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(16): p. 4431-40.

195. Varfolomeev, E.E., et al., *Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally*. Immunity, 1998. **9**(2): p. 267-76.
196. Lemmers, B., et al., *Essential role for caspase-8 in Toll-like receptors and NFkappaB signaling*. J Biol Chem, 2007. **282**(10): p. 7416-23.
197. Su, H., et al., *Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor*. Science, 2005. **307**(5714): p. 1465-8.
198. Koenig, A., et al., *Spatial differences in active caspase-8 defines its role in T-cell activation versus cell death*. Cell Death Differ, 2008. **15**(11): p. 1701-11.
199. Chun, H.J., et al., *Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency*. Nature, 2002. **419**(6905): p. 395-9.
200. Fernandes-Alnemri, T., et al., *In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7464-9.
201. Vincenz, C. and V.M. Dixit, *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**(10): p. 6578-83.
202. Kischkel, F.C., et al., *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 46639-46.
203. Wang, J., et al., *Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13884-8.
204. Milhas, D., et al., *Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 19836-42.
205. Sprick, M.R., et al., *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, 2002. **21**(17): p. 4520-30.
206. Wang, J., et al., *Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II*. Cell, 1999. **98**(1): p. 47-58.
207. Gronbaek, K., et al., *The V410I (G1228A) variant of the caspase-10 gene is a common polymorphism of the Danish population*. Blood, 2000. **95**(6): p. 2184-5.
208. Zhu, S., et al., *Genetic alterations in caspase-10 may be causative or protective in autoimmune lymphoproliferative syndrome*. Hum Genet, 2006. **119**(3): p. 284-94.
209. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
210. Qin, H., et al., *Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 549-57.
211. Srinivasula, S.M., et al., *Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization*. Mol Cell, 1998. **1**(7): p. 949-57.
212. Scaffidi, C., et al., *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. Embo J, 1998. **17**(6): p. 1675-87.
213. Hakem, R., et al., *Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo*. Cell, 1998. **94**(3): p. 339-52.
214. Hirata, H., et al., *Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis*. J Exp Med, 1998. **187**(4): p. 587-600.
215. Shi, Y., *Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis*. Mol Cell, 2002. **9**(3): p. 459-70.
216. Riedl, S.J., et al., *Structural basis for the activation of human procaspase-7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 14790-5.
217. Kothakota, S., et al., *Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis*. Science, 1997. **278**(5336): p. 294-8.
218. Slee, E.A., C. Adrain, and S.J. Martin, *Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7320-6.
219. Wen, L.P., et al., *Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 26056-61.
220. Levkau, B., et al., *Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis*. J Exp Med, 1998. **187**(4): p. 579-86.
221. Ruchaud, S., et al., *Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation*. EMBO J, 2002. **21**(8): p. 1967-77.
222. Nagata, S., *Apoptotic DNA fragmentation*. Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 12-8.

223. Liu, X., et al., *The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8461-6.
224. Enari, M., et al., *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 43-50.
225. Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata, *Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 96-9.
226. Li, L.Y., X. Luo, and X. Wang, *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria*. Nature, 2001. **412**(6842): p. 95-9.
227. Los, M., et al., *Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(3): p. 978-88.
228. Hong, S.J., T.M. Dawson, and V.L. Dawson, *Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(5): p. 259-64.
229. Berger, J.M., et al., *Structure and mechanism of DNA topoisomerase II*. Nature, 1996. **379**(6562): p. 225-32.
230. Osheroff, N., *Effect of antineoplastic agents on the DNA cleavage/religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: inhibition of DNA religation by etoposide*. Biochemistry, 1989. **28**(15): p. 6157-60.
231. Norbury, C.J. and B. Zhivotovsky, *DNA damage-induced apoptosis*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2797-808.
232. Chipuk, J.E. and D.R. Green, *Dissecting p53-dependent apoptosis*. Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 994-1002.
233. Yin, C., et al., *Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo*. Nature, 1997. **385**(6617): p. 637-40.
234. Miyashita, T., et al., *Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene*. Cancer Res, 1994. **54**(12): p. 3131-5.
235. Kasibhatla, S., et al., *DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 543-51.
236. Sheard, M.A., et al., *Up-regulation of Fas (CD95) in human p53 wild-type cancer cells treated with ionizing radiation*. Int J Cancer, 1997. **73**(5): p. 757-62.
237. Munsch, D., et al., *Human and mouse Fas (APO-1/CD95) death receptor genes each contain a p53-responsive element that is activated by p53 mutants unable to induce apoptosis*. J Biol Chem, 2000. **275**(6): p. 3867-72.
238. Jarvis, W.D., et al., *Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C*. Cancer Res, 1994. **54**(7): p. 1707-14.
239. Villalba, M., P. Bushway, and A. Altman, *Protein kinase C-theta mediates a selective T cell survival signal via phosphorylation of BAD*. J Immunol, 2001. **166**(10): p. 5955-63.
240. Zha, J., et al., *Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)*. Cell, 1996. **87**(4): p. 619-28.
241. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1322-6.
242. Willis, S.N., et al., *Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins*. Genes Dev, 2005. **19**(11): p. 1294-305.
243. Willis, S.N., et al., *Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak*. Science, 2007. **315**(5813): p. 856-9.
244. Chen, L., et al., *Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function*. Mol Cell, 2005. **17**(3): p. 393-403.
245. Verhagen, A.M., et al., *Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins*. Cell, 2000. **102**(1): p. 43-53.
246. Zou, H., et al., *An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11549-56.
247. Susin, S.A., et al., *Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis*. J Exp Med, 2000. **192**(4): p. 571-80.
248. Du, C., et al., *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition*. Cell, 2000. **102**(1): p. 33-42.
249. Green, D.R. and J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-12.
250. Minn, A.J., et al., *Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes*. Nature, 1997. **385**(6614): p. 353-7.

251. Antonsson, B., et al., *Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2*. Science, 1997. **277**(5324): p. 370-2.
252. Schendel, S.L., et al., *Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5113-8.
253. Korsmeyer, S.J., et al., *Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c*. Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1166-73.
254. Marzo, I., C. Brenner, and G. Kroemer, *The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes*. Biomed Pharmacother, 1998. **52**(6): p. 248-51.
255. Narita, M., et al., *Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14681-6.
256. Scaffidi, C., et al., *Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22532-8.
257. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell, 1998. **94**(4): p. 491-501.
258. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. **94**(4): p. 481-90.
259. Jost, P.J., et al., *XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis*. Nature, 2009. **460**(7258): p. 1035-9.
260. Shawgo, M.E., S.N. Shelton, and J.D. Robertson, *Caspase-9 activation by the apoptosome is not required for fas-mediated apoptosis in type II Jurkat cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(48): p. 33447-55.
261. Li, L., et al., *A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNFalpha-mediated cell death*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1471-4.
262. Samraj, A.K., et al., *Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis*. J Biol Chem, 2006. **281**(40): p. 29652-9.
263. Algeciras-Schimmich, A., et al., *Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11445-50.
264. Lin, T., et al., *Role of acidic sphingomyelinase in Fas/CD95-mediated cell death*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8657-63.
265. Bezombes, C., et al., *Lysosomal sphingomyelinase is not solicited for apoptosis signaling*. FASEB J, 2001. **15**(2): p. 297-9.
266. Watanabe, 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): p. 1000-7.
267. Lafont, E., et al., *Caspase-mediated inhibition of sphingomyelin synthesis is involved in FasL-triggered cell death*. Cell Death Differ. **17**(4): p. 642-54.
268. Granot, T., et al., *Caspase-dependent and -independent cell death of Jurkat human leukemia cells induced by novel synthetic ceramide analogs*. Leukemia, 2006. **20**(3): p. 392-9.
269. Mathias, S., L.A. Pena, and R.N. Kolesnick, *Signal transduction of stress via ceramide*. Biochem J, 1998. **335** (Pt 3): p. 465-80.
270. Chang, H.Y., et al., *Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx*. Science, 1998. **281**(5384): p. 1860-3.
271. Yang, X., et al., *Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis*. Cell, 1997. **89**(7): p. 1067-76.
272. Cuvillier, O., et al., *Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate*. Nature, 1996. **381**(6585): p. 800-3.
273. Sanna, M.G., et al., *Selective activation of JNK1 is necessary for the anti-apoptotic activity of hILP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6015-20.
274. Tobiume, K., et al., *ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis*. EMBO Rep, 2001. **2**(3): p. 222-8.
275. Kawahara, A., et al., *Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain*. J Cell Biol, 1998. **143**(5): p. 1353-60.
276. Vercammen, D., et al., *Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways*. J Exp Med, 1998. **188**(5): p. 919-30.
277. Holler, N., et al., *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 489-95.
278. Vanden Berghe, T., et al., *Differential signaling to apoptotic and necrotic cell death by Fas-associated death domain protein FADD*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7925-33.

279. Lin, Y., et al., *Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(19): p. 2514-26.
280. Martinon, F., et al., *Activation of a pro-apoptotic amplification loop through inhibition of NF-kappaB-dependent survival signals by caspase-mediated inactivation of RIP*. FEBS Lett, 2000. **468**(2-3): p. 134-6.
281. Kim, J.S., et al., *Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes*. Curr Mol Med, 2003. **3**(6): p. 527-35.
282. Goossens, V., et al., *Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8115-9.
283. Shinohara, H., et al., *Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal-regulated kinase activation*. Cancer Res, 2000. **60**(6): p. 1766-72.
284. Kleber, S., et al., *Yes and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma*. Cancer Cell, 2008. **13**(3): p. 235-48.
285. Yeh, W.C., et al., *Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development*. Immunity, 2000. **12**(6): p. 633-42.
286. Yang, J.K., *FLIP as an anti-cancer therapeutic target*. Yonsei Med J, 2008. **49**(1): p. 19-27.
287. Micheau, O. and J. Tschopp, *Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. Cell, 2003. **114**(2): p. 181-90.
288. Boatright, K.M., et al., *A unified model for apical caspase activation*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 529-41.
289. Tschopp, J., M. Irmeler, and M. Thome, *Inhibition of fas death signals by FLIPs*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(5): p. 552-8.
290. Chang, D.W., et al., *c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis*. EMBO J, 2002. **21**(14): p. 3704-14.
291. Krueger, A., et al., *Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20633-40.
292. Kataoka, T. and J. Tschopp, *N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(7): p. 2627-36.
293. Kreuz, S., et al., *NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP*. J Cell Biol, 2004. **166**(3): p. 369-80.
294. Legembre, P., B.C. Barnhart, and M.E. Peter, *The relevance of NF-kappaB for CD95 signaling in tumor cells*. Cell Cycle, 2004. **3**(10): p. 1235-9.
295. Budd, R.C., W.C. Yeh, and J. Tschopp, *cFLIP regulation of lymphocyte activation and development*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(3): p. 196-204.
296. Salvesen, G.S. and C.S. Duckett, *IAP proteins: blocking the road to death's door*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(6): p. 401-10.
297. Bratton, S.B., et al., *Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes*. EMBO J, 2001. **20**(5): p. 998-1009.
298. Deveraux, Q.L., et al., *Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases*. EMBO J, 1999. **18**(19): p. 5242-51.
299. Deveraux, Q.L., et al., *X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases*. Nature, 1997. **388**(6639): p. 300-4.
300. Srinivasula, S.M., et al., *A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 112-6.
301. Shiozaki, E.N., et al., *Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 519-27.
302. Riedl, S.J., et al., *Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP*. Cell, 2001. **104**(5): p. 791-800.
303. Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, and R. Takahashi, *Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8662-7.
304. Condorelli, G., et al., *PED/PEA-15: an anti-apoptotic molecule that regulates FAS/TNFR1-induced apoptosis*. Oncogene, 1999. **18**(31): p. 4409-15.
305. Renganathan, H., et al., *Phosphorylation of PEA-15 switches its binding specificity from ERK/MAPK to FADD*. Biochem J, 2005. **390**(Pt 3): p. 729-35.
306. Peacock, J.W., et al., *PTEN loss promotes mitochondrially dependent type II Fas-induced apoptosis via PEA-15*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(5): p. 1222-34.

307. Searles, R.P., et al., *Sequence and genomic analysis of a Rhesus macaque rhadinovirus with similarity to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 3040-53.
308. Hu, S., et al., *I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(28): p. 17255-7.
309. Thome, M., et al., *Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 517-21.
310. Ray, C.A., et al., *Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme*. Cell, 1992. **69**(4): p. 597-604.
311. Zhou, Q., et al., *Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7797-800.
312. Li, P., et al., *Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock*. Cell, 1995. **80**(3): p. 401-11.
313. Bump, N.J., et al., *Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35*. Science, 1995. **269**(5232): p. 1885-8.
314. Clem, R.J., M. Fechheimer, and L.K. Miller, *Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells*. Science, 1991. **254**(5036): p. 1388-90.
315. Crook, N.E., R.J. Clem, and L.K. Miller, *An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif*. J Virol, 1993. **67**(4): p. 2168-74.
316. Jerome, K.R., et al., *HSV and glycoprotein J inhibit caspase activation and apoptosis induced by granzyme B or Fas*. J Immunol, 2001. **167**(7): p. 3928-35.
317. Garcia-Calvo, M., et al., *Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32608-13.
318. Brown, D.A. and J.K. Rose, *Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface*. Cell, 1992. **68**(3): p. 533-44.
319. Rietveld, A., et al., *Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with Drosophila raft lipid microdomains*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 12049-54.
320. Brown, D.A. and E. London, *Functions of lipid rafts in biological membranes*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 111-36.
321. Parton, R.G., *Caveolae and caveolins*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(4): p. 542-8.
322. Tran, D., et al., *Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(22): p. 7957-61.
323. Ghitescu, L., et al., *Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis*. J Cell Biol, 1986. **102**(4): p. 1304-11.
324. Anderson, R.G., et al., *Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae*. Science, 1992. **255**(5043): p. 410-1.
325. Anderson, R.G., *Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 10909-13.
326. Fra, A.M., et al., *Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae*. J Biol Chem, 1994. **269**(49): p. 30745-8.
327. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
328. Varma, R. and S. Mayor, *GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface*. Nature, 1998. **394**(6695): p. 798-801.
329. Viola, A., et al., *T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains*. Science, 1999. **283**(5402): p. 680-2.
330. Tosello, A.C., et al., *Activation of T cells via CD55: recruitment of early components of the CD3-TCR pathway is required for IL-2 secretion*. J Inflamm, 1998. **48**(1): p. 13-27.
331. Yashiro-Ohtani, Y., et al., *Non-CD28 costimulatory molecules present in T cell rafts induce T cell costimulation by enhancing the association of TCR with rafts*. J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1251-9.
332. Leitinger, B. and N. Hogg, *The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 5): p. 963-72.
333. Monks, C.R., et al., *Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells*. Nature, 1998. **395**(6697): p. 82-6.
334. Cinek, T., I. Hilgert, and V. Horejsi, *An alternative way of CD4 and CD8 association with protein kinases of the Src family*. Immunogenetics, 1995. **41**(2-3): p. 110-6.
335. Xavier, R., et al., *Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation*. Immunity, 1998. **8**(6): p. 723-32.

336. Rodgers, W., B. Crise, and J.K. Rose, *Signals determining protein tyrosine kinase and glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein targeting to a glycolipid-enriched membrane fraction*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(8): p. 5384-91.
337. van't Hof, W. and M.D. Resh, *Dual fatty acylation of p59(Fyn) is required for association with the T cell receptor zeta chain through phosphotyrosine-Src homology domain-2 interactions*. J Cell Biol, 1999. **145**(2): p. 377-89.
338. Lin, J., A. Weiss, and T.S. Finco, *Localization of LAT in glycolipid-enriched microdomains is required for T cell activation*. J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 28861-4.
339. Scheel-Toellner, D., et al., *The death-inducing signalling complex is recruited to lipid rafts in Fas-induced apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **297**(4): p. 876-9.
340. Garofalo, T., et al., *Association of the death-inducing signaling complex with microdomains after triggering through CD95/Fas. Evidence for caspase-8-ganglioside interaction in T cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8309-15.
341. Legembre, P., et al., *Potential of Fas-mediated apoptosis by an engineered glycosylphosphatidylinositol-linked Fas*. Cell Death Differ, 2002. **9**(3): p. 329-39.
342. Grassme, H., et al., *CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20589-96.
343. Gajate, C., et al., *Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis*. Int J Cancer, 2000. **85**(5): p. 674-82.
344. Gajate, C. and F. Mollinedo, *The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells*. Blood, 2001. **98**(13): p. 3860-3.
345. Delmas, D., et al., *Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 41482-90.
346. Ruiter, G.A., et al., *Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway*. Anticancer Drugs, 2003. **14**(2): p. 167-73.
347. Domin, J. and M.D. Waterfield, *Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members*. FEBS Lett, 1997. **410**(1): p. 91-5.
348. Hawkins, P.T., T.R. Jackson, and L.R. Stephens, *Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P₃ by activating a PtdIns(4,5)P₂ 3-OH kinase*. Nature, 1992. **358**(6382): p. 157-9.
349. Stephens, L.R., K.T. Hughes, and R.F. Irvine, *Pathway of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils*. Nature, 1991. **351**(6321): p. 33-9.
350. Vanhaesebroeck, B., et al., *Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 535-602.
351. Dhand, R., et al., *PI 3-kinase: structural and functional analysis of intersubunit interactions*. EMBO J, 1994. **13**(3): p. 511-21.
352. Klippel, A., et al., *A region of the 85-kilodalton (kDa) subunit of phosphatidylinositol 3-kinase binds the 110-kDa catalytic subunit in vivo*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(9): p. 5560-6.
353. Otsu, M., et al., *Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60c-src complexes, and PI3-kinase*. Cell, 1991. **65**(1): p. 91-104.
354. Gaidarov, I., et al., *The class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking*. Mol Cell, 2001. **7**(2): p. 443-9.
355. Herman, P.K., J.H. Stack, and S.D. Emr, *An essential role for a protein and lipid kinase complex in secretory protein sorting*. Trends Cell Biol, 1992. **2**(12): p. 363-8.
356. Volinia, S., et al., *A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system*. EMBO J, 1995. **14**(14): p. 3339-48.
357. Gillooly, D.J., A. Simonsen, and H. Stenmark, *Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins*. Biochem J, 2001. **355**(Pt 2): p. 249-58.
358. Wurmser, A.E. and S.D. Emr, *Novel PtdIns(3)P-binding protein Etf1 functions as an effector of the Vps34 PtdIns 3-kinase in autophagy*. J Cell Biol, 2002. **158**(4): p. 761-72.
359. Fu, Z., et al., *The iSH2 domain of PI 3-kinase is a rigid tether for p110 and not a conformational switch*. Arch Biochem Biophys, 2004. **432**(2): p. 244-51.
360. Yu, J., C. Wjasow, and J.M. Backer, *Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30199-203.
361. Fruman, D.A., et al., *Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha*. Nat Genet, 2000. **26**(3): p. 379-82.

362. Yu, J., et al., *Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(3): p. 1379-87.
363. Jimenez, C., et al., *The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 41556-62.
364. Ueki, K., et al., *Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 48453-66.
365. Ueki, K., et al., *Increased insulin sensitivity in mice lacking p85beta subunit of phosphoinositide 3-kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 419-24.
366. Harpur, A.G., et al., *Intermolecular interactions of the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12323-32.
367. Luo, J., et al., *The p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase down-regulates IRS-1 signaling via the formation of a sequestration complex*. J Cell Biol, 2005. **170**(3): p. 455-64.
368. Barbour, L.A., et al., *Increased P85alpha is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces in vivo insulin resistance associated with growth hormone excess*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37489-94.
369. Carpenter, C.L., et al., *Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit*. J Biol Chem, 1993. **268**(13): p. 9478-83.
370. Kontos, C.D., et al., *Tyrosine 1101 of Tie2 is the major site of association of p85 and is required for activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 4131-40.
371. O'Brien, R., et al., *Alternative modes of binding of proteins with tandem SH2 domains*. Protein Sci, 2000. **9**(3): p. 570-9.
372. Skolnik, E.Y., et al., *Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases*. Cell, 1991. **65**(1): p. 83-90.
373. Nolte, R.T., et al., *Crystal structure of the PI 3-kinase p85 amino-terminal SH2 domain and its phosphopeptide complexes*. Nat Struct Biol, 1996. **3**(4): p. 364-74.
374. Kodaki, T., et al., *The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras*. Curr Biol, 1994. **4**(9): p. 798-806.
375. von Willebrand, M., et al., *Modification of phosphatidylinositol 3-kinase SH2 domain binding properties by Abl- or Lck-mediated tyrosine phosphorylation at Tyr-688*. J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 3994-4000.
376. Cuevas, B.D., et al., *Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 27455-61.
377. Farias, E.F., C. Marzan, and R. Mira-y-Lopez, *Cellular retinol-binding protein-I inhibits PI3K/Akt signaling through a retinoic acid receptor-dependent mechanism that regulates p85-p110 heterodimerization*. Oncogene, 2005. **24**(9): p. 1598-606.
378. Martinez-Lorenzo, M.J., et al., *Tyrosine phosphorylation of the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase correlates with high proliferation rates in sublines derived from the Jurkat leukemia*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. **32**(4): p. 435-45.
379. Myers, M.P., et al., *The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13513-8.
380. Maehama, T., G.S. Taylor, and J.E. Dixon, *PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 247-79.
381. Cantley, L.C. and B.G. Neel, *New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4240-5.
382. Simpson, L. and R. Parsons, *PTEN: life as a tumor suppressor*. Exp Cell Res, 2001. **264**(1): p. 29-41.
383. Butler, M.G., et al., *Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations*. J Med Genet, 2005. **42**(4): p. 318-21.
384. Oudit, G.Y., et al., *The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(2): p. 449-71.
385. Stambolic, V., et al., *Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN*. Cell, 1998. **95**(1): p. 29-39.
386. Sun, H., et al., *PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6199-204.

387. Damen, J.E., et al., *The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(4): p. 1689-93.
388. Lioubin, M.N., et al., *p150Ship, a signal transduction molecule with inositol polyphosphate-5-phosphatase activity*. Genes Dev, 1996. **10**(9): p. 1084-95.
389. Pesesse, X., et al., *Identification of a second SH2-domain-containing protein closely related to the phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **239**(3): p. 697-700.
390. Brauweiler, A.M., I. Tamir, and J.C. Cambier, *Bilevel control of B-cell activation by the inositol 5-phosphatase SHIP*. Immunol Rev, 2000. **176**: p. 69-74.
391. Scheid, M.P., P.A. Marignani, and J.R. Woodgett, *Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(17): p. 6247-60.
392. Wada, T., et al., *Overexpression of SH2-containing inositol phosphatase 2 results in negative regulation of insulin-induced metabolic actions in 3T3-L1 adipocytes via its 5'-phosphatase catalytic activity*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(5): p. 1633-46.
393. Ganesan, L.P., et al., *FcgammaR-induced production of superoxide and inflammatory cytokines is differentially regulated by SHIP through its influence on PI3K and/or Ras/Erk pathways*. Blood, 2006. **108**(2): p. 718-25.
394. Isnardi, I., et al., *The SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase SHIP1 is recruited to the intracytoplasmic domain of human FcgammaRIIB and is mandatory for negative regulation of B cell activation*. Immunol Lett, 2006. **104**(1-2): p. 156-65.
395. Carver, D.J., M.J. Aman, and K.S. Ravichandran, *SHIP inhibits Akt activation in B cells through regulation of Akt membrane localization*. Blood, 2000. **96**(4): p. 1449-56.
396. Vlahos, C.J., et al., *A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)*. J Biol Chem, 1994. **269**(7): p. 5241-8.
397. Yano, H., et al., *Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells*. J Biol Chem, 1993. **268**(34): p. 25846-56.
398. Franke, T.F., K.D. Tartof, and P.N. Tsichlis, *The SH2-like Akt homology (AH) domain of c-akt is present in multiple copies in the genome of vertebrate and invertebrate eucaryotes. Cloning and characterization of the Drosophila melanogaster c-akt homolog Dakt1*. Oncogene, 1994. **9**(1): p. 141-8.
399. Alessi, D.R., et al., *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha*. Curr Biol, 1997. **7**(4): p. 261-9.
400. James, S.R., et al., *Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation*. Biochem J, 1996. **315** (Pt 3): p. 709-13.
401. Stokoe, D., et al., *Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B*. Science, 1997. **277**(5325): p. 567-70.
402. Banfic, H., C.P. Downes, and S.E. Rittenhouse, *Biphasic activation of PKBalpha/Akt in platelets. Evidence for stimulation both by phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate, produced via a novel pathway, and by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. J Biol Chem, 1998. **273**(19): p. 11630-7.
403. Ahmed, N.N., et al., *The proteins encoded by c-akt and v-akt differ in post-translational modification, subcellular localization and oncogenic potential*. Oncogene, 1993. **8**(7): p. 1957-63.
404. Alessi, D.R., et al., *Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase*. FEBS Lett, 1996. **399**(3): p. 333-8.
405. Chan, T.O., S.E. Rittenhouse, and P.N. Tsichlis, *AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 965-1014.
406. Xu, J., D. Liu, and Z. Songyang, *The role of Asp-462 in regulating Akt activity*. J Biol Chem, 2002. **277**(38): p. 35561-6.
407. Jahani-Asl, A., A. Basak, and B.K. Tsang, *Caspase-3-mediated cleavage of Akt: involvement of non-consensus sites and influence of phosphorylation*. FEBS Lett, 2007. **581**(16): p. 2883-8.
408. Alessi, D.R., et al., *3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase*. Curr Biol, 1997. **7**(10): p. 776-89.
409. Stephens, L., et al., *Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B*. Science, 1998. **279**(5351): p. 710-4.
410. Partovian, C. and M. Simons, *Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase Calpha in endothelial cells*. Cell Signal, 2004. **16**(8): p. 951-7.

411. Sarbassov, D.D., et al., *Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton*. *Curr Biol*, 2004. **14**(14): p. 1296-302.
412. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. *Science*, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
413. Bellacosa, A., et al., *Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain*. *Oncogene*, 1998. **17**(3): p. 313-25.
414. Milburn, C.C., et al., *Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change*. *Biochem J*, 2003. **375**(Pt 3): p. 531-8.
415. Andjelkovic, N., et al., *The catalytic subunit of protein phosphatase 2A associates with the translation termination factor eRF1*. *EMBO J*, 1996. **15**(24): p. 7156-67.
416. Ugi, S., et al., *Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(19): p. 8778-89.
417. Yoshizaki, T., et al., *Protein phosphatase-2C alpha as a positive regulator of insulin sensitivity through direct activation of phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(21): p. 22715-26.
418. Gao, T., F. Furnari, and A.C. Newton, *PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth*. *Mol Cell*, 2005. **18**(1): p. 13-24.
419. Samuels, Y. and V.E. Velculescu, *Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers*. *Cell Cycle*, 2004. **3**(10): p. 1221-4.
420. Hartmann, C., et al., *PIK3CA mutations in glioblastoma multiforme*. *Acta Neuropathol*, 2005. **109**(6): p. 639-42.
421. Li, Z., et al., *Regulation of PTEN by Rho small GTPases*. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(4): p. 399-404.
422. Lee, H.Y., et al., *Chemopreventive effects of deguelin, a novel Akt inhibitor, on tobacco-induced lung tumorigenesis*. *J Natl Cancer Inst*, 2005. **97**(22): p. 1695-9.
423. Wu, G., et al., *Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(8): p. 4688-93.
424. Tao, W., et al., *Wrch-1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1*. *Genes Dev*, 2001. **15**(14): p. 1796-807.
425. Wang, Y., et al., *PIK3CA mutations in advanced ovarian carcinomas*. *Hum Mutat*, 2005. **25**(3): p. 322.
426. Shayesteh, L., et al., *PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer*. *Nat Genet*, 1999. **21**(1): p. 99-102.
427. Samuels, Y. and K. Ericson, *Oncogenic PI3K and its role in cancer*. *Curr Opin Oncol*, 2006. **18**(1): p. 77-82.
428. Xu, X., et al., *Akt2 expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma*. *Oncol Rep*, 2004. **11**(1): p. 25-32.
429. Roy, H.K., et al., *AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis*. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(1): p. 201-5.
430. Stal, O., et al., *Akt kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy*. *Breast Cancer Res*, 2003. **5**(2): p. R37-44.
431. Irie, H.Y., et al., *Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition*. *J Cell Biol*, 2005. **171**(6): p. 1023-34.
432. Ali, I.U., L.M. Schriml, and M. Dean, *Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity*. *J Natl Cancer Inst*, 1999. **91**(22): p. 1922-32.
433. Whang, Y.E., et al., *Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(9): p. 5246-50.
434. Georgescu, M.M., et al., *The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(18): p. 10182-7.
435. Wang, S.I., et al., *Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme*. *Cancer Res*, 1997. **57**(19): p. 4183-6.
436. Kawamura, N., et al., *PTEN/MMAC1 mutations in hepatocellular carcinomas: somatic inactivation of both alleles in tumors*. *Jpn J Cancer Res*, 1999. **90**(4): p. 413-8.
437. Nakahara, Y., et al., *Mutational analysis of the PTEN/MMAC1 gene in non-Hodgkin's lymphoma*. *Leukemia*, 1998. **12**(8): p. 1277-80.
438. Sakai, A., et al., *PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms*. *Blood*, 1998. **92**(9): p. 3410-5.
439. Celebi, J.T., et al., *Identification of PTEN mutations in metastatic melanoma specimens*. *J Med Genet*, 2000. **37**(9): p. 653-7.

440. Yokoyama, Y., et al., *Expression of PTEN and PTEN pseudogene in endometrial carcinoma*. Int J Mol Med, 2000. **6**(1): p. 47-50.
441. Forgacs, E., et al., *Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in lung cancer*. Oncogene, 1998. **17**(12): p. 1557-65.
442. Hausler, P., et al., *Protection of CD95-mediated apoptosis by activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B*. Eur J Immunol, 1998. **28**(1): p. 57-69.
443. Su, C.C., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by integrin-tumor matrix interaction suppresses Fas-mediated apoptosis in T cells*. J Immunol, 2007. **179**(7): p. 4589-97.
444. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
445. del Peso, L., et al., *Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt*. Science, 1997. **278**(5338): p. 687-9.
446. Cardone, M.H., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1318-21.
447. Trencia, A., et al., *Protein kinase B/Akt binds and phosphorylates PED/PEA-15, stabilizing its antiapoptotic action*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(13): p. 4511-21.
448. Dan, H.C., et al., *Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5405-12.
449. Burgering, B.M. and R.H. Medema, *Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(6): p. 689-701.
450. Chen, C., L.C. Edelstein, and C. Gelinas, *The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L)*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(8): p. 2687-95.
451. Jones, R.G., et al., *Protein kinase B regulates T lymphocyte survival, nuclear factor kappaB activation, and Bcl-X(L) levels in vivo*. J Exp Med, 2000. **191**(10): p. 1721-34.
452. Kreuz, S., et al., *NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3964-73.
453. Hong, S.Y., et al., *Involvement of two NF-kappa B binding elements in tumor necrosis factor alpha -, CD40-, and Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-mediated induction of the cellular inhibitor of apoptosis protein 2 gene*. J Biol Chem, 2000. **275**(24): p. 18022-8.
454. Uriarte, S.M., et al., *Akt inhibition upregulates FasL, downregulates c-FLIPs and induces caspase-8-dependent cell death in Jurkat T lymphocytes*. Cell Death Differ, 2005. **12**(3): p. 233-42.
455. Varadhachary, A.S., et al., *Selective up-regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activity in Th2 cells inhibits caspase-8 cleavage at the death-inducing complex: a mechanism for Th2 resistance from Fas-mediated apoptosis*. J Immunol, 1999. **163**(9): p. 4772-9.
456. Varadhachary, A.S., et al., *Phosphatidylinositol 3'-kinase blocks CD95 aggregation and caspase-8 cleavage at the death-inducing signaling complex by modulating lateral diffusion of CD95*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6564-9.
457. Jones, R.G., et al., *CD28-dependent activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly*. J Exp Med, 2002. **196**(3): p. 335-48.
458. Beneteau, M., et al., *Dominant-negative Fas mutation is reversed by down-expression of c-FLIP*. Cancer Res, 2007. **67**(1): p. 108-15.
459. Friesen, C., et al., *Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells*. Nat Med, 1996. **2**(5): p. 574-7.
460. Muller, M., et al., *Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53*. J Clin Invest, 1997. **99**(3): p. 403-13.
461. Lacour, S., et al., *Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells*. Cancer Res, 2004. **64**(10): p. 3593-8.
462. Beneteau, M., et al., *Localization of Fas/CD95 into the Lipid Rafts on Down-Modulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(4): p. 604-13.
463. Berke, G., *The CTL's kiss of death*. Cell, 1995. **81**(1): p. 9-12.
464. Montel, A.H., et al., *Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells*. Cell Immunol, 1995. **166**(2): p. 236-46.
465. Legembre, P., et al., *Cutting edge: modulation of fas-mediated apoptosis by lipid rafts in T lymphocytes*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 716-20.
466. Stel, A.J., et al., *Fas receptor clustering and involvement of the death receptor pathway in rituximab-mediated apoptosis with concomitant sensitization of lymphoma B cells to fas-induced apoptosis*. J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2287-95.

467. Delmas, D., et al., *Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells*. *Oncogene*, 2004. **23**(55): p. 8979-86.
468. Barnhart, B.C., E.C. Alappat, and M.E. Peter, *The CD95 type I/type II model*. *Semin Immunol*, 2003. **15**(3): p. 185-93.
469. Legembre, P., et al., *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**(11): p. 5659-62.
470. Calleja, V., et al., *Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition*. *PLoS Biol*, 2009. **7**(1): p. e17.
471. Thimmaiah, K.N., et al., *Identification of N10-substituted phenoxazines as potent and specific inhibitors of Akt signaling*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(36): p. 31924-35.
472. Yang, J., et al., *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked*. *Science*, 1997. **275**(5303): p. 1129-32.
473. Gingras, A.C., et al., *4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway*. *Genes Dev*, 1998. **12**(4): p. 502-13.
474. Aoki, M., E. Blazek, and P.K. Vogt, *A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3k and Akt*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(1): p. 136-41.
475. Hutchinson, J.N., et al., *Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion*. *Cancer Res*, 2004. **64**(9): p. 3171-8.
476. Arboleda, M.J., et al., *Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells*. *Cancer Res*, 2003. **63**(1): p. 196-206.
477. Iliopoulos, D., et al., *MicroRNAs differentially regulated by Akt isoforms control EMT and stem cell renewal in cancer cells*. *Sci Signal*, 2009. **2**(92): p. ra62.
478. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. *Cell*, 1999. **96**(6): p. 857-68.
479. Panka, D.J., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(10): p. 6893-6.
480. Hawkins, P.T., et al., *PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase*. *Curr Biol*, 1995. **5**(4): p. 393-403.
481. Jimenez, C., et al., *Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration*. *J Cell Biol*, 2000. **151**(2): p. 249-62.
482. Cenni, V., et al., *Targeting of the Akt/PKB kinase to the actin skeleton*. *Cell Mol Life Sci*, 2003. **60**(12): p. 2710-20.
483. Vandermoere, F., et al., *Proteomics exploration reveals that actin is a signaling target of the kinase Akt*. *Mol Cell Proteomics*, 2007. **6**(1): p. 114-24.
484. Villalba, M., et al., *Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells*. *J Cell Biol*, 2001. **155**(3): p. 331-8.
485. Huang, Y. and J.K. Burkhardt, *T-cell-receptor-dependent actin regulatory mechanisms*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 5): p. 723-30.
486. Lozupone, F., et al., *Identification and relevance of the CD95-binding domain in the N-terminal region of ezrin*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(10): p. 9199-207.
487. Gautreau, A., et al., *Ezrin, a plasma membrane-microfilament linker, signals cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(13): p. 7300-5.
488. Shiue, H., et al., *Akt2 phosphorylates ezrin to trigger NHE3 translocation and activation*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(2): p. 1688-95.
489. Barret, C., et al., *Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution*. *J Cell Biol*, 2000. **151**(5): p. 1067-80.
490. Laux, T., et al., *GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism*. *J Cell Biol*, 2000. **149**(7): p. 1455-72.
491. Parmryd, I., et al., *Imaging metabolism of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in T-cell GM1-enriched domains containing Ras proteins*. *Exp Cell Res*, 2003. **285**(1): p. 27-38.
492. Rozelle, A.L., et al., *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3*. *Curr Biol*, 2000. **10**(6): p. 311-20.
493. McCabe, J.B. and L.G. Berthiaume, *Functional roles for fatty acylated amino-terminal domains in subcellular localization*. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(11): p. 3771-86.

494. Wolven, A., et al., *Palmitoylation of p59fyn is reversible and sufficient for plasma membrane association*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(6): p. 1159-73.
495. Cho, S. and G. Dawson, *Palmitoyl protein thioesterase 1 protects against apoptosis mediated by Ras-Akt-caspase pathway in neuroblastoma cells*. J Neurochem, 2000. **74**(4): p. 1478-88.
496. Rebillard, A., et al., *Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification via inhibition of NHE1 in human colon cancer cells*. Cancer Res, 2007. **67**(16): p. 7865-74.
497. Nourissat, P., et al., *Ethanol induces oxidative stress in primary rat hepatocytes through the early involvement of lipid raft clustering*. Hepatology, 2008. **47**(1): p. 59-70.
498. Snabaitis, A.K., F. Cuello, and M. Avkiran, *Protein kinase B/Akt phosphorylates and inhibits the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger NHE1*. Circ Res, 2008. **103**(8): p. 881-90.
499. Storme, G.A., et al., *Antiinvasive effect of racemic 1-O-octadecyl-2-O-methylglycero-3-phosphocholine on MO4 mouse fibrosarcoma cells in vitro*. Cancer Res, 1985. **45**(1): p. 351-7.
500. Schlottmann, K.E., et al., *Activation of Src-family tyrosine kinases during Fas-induced apoptosis*. J Leukoc Biol, 1996. **60**(4): p. 546-54.
501. Sharif-Askari, E., et al., *p56Lck tyrosine kinase enhances the assembly of death-inducing signaling complex during Fas-mediated apoptosis*. J Biol Chem, 2007. **282**(49): p. 36048-56.
502. Kabouridis, P.S., A.I. Magee, and S.C. Ley, *S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes*. EMBO J, 1997. **16**(16): p. 4983-98.
503. Straus, D.B. and A. Weiss, *Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor*. Cell, 1992. **70**(4): p. 585-93.
504. Wymann, M.P., M. Zvelebil, and M. Laffargue, *Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target?* Trends Pharmacol Sci, 2003. **24**(7): p. 366-76.

ANNEXES

Title: CD95 and Caspase-12 in the immune response.

Titre: CD95 et Caspase-12 dans la réponse immunitaire

Authors: Charlotte Behr^{1,2,3,¶}, Mathieu Pizon^{1,2,3} and Patrick Legembre^{1,2,3,¶}.

Affiliations: ¹CNRS UMR 5164, ²Université Bordeaux-2, ³IFR-66, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

¶Corresponding authors: Dr Patrick Legembre, Tel. (+33) 5-57-57-11-24, Fax. (+33) 5-57-57-14-72, e-mail address: patrick.legembre@inserm.fr, Dr Charlotte Behr, Tel. (+33) 5-57-57-92-33, Fax. (+33) 5-57-57-14-72, e-mail address: charlotte.behr@u-bordeaux2.fr

Key words: Apoptosis, caspase, lymphoma, autoimmunity.

Résumé

Le récepteur de mort CD95 appartient à la famille du récepteur au TNF (Tumor necrosis factor). Ce récepteur est retrouvé muté et non fonctionnel dans les souris Lpr et Lpr^{cg} et chez les patients atteints d'ALPS de type Ia (Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome). Ces mutations du récepteur CD95 bloquent le signal apoptotique et entraînent chez le patient comme chez la souris, une lymphoprolifération, des adénopathies, une splénomégalie, une accumulation d'une population lymphocytaire T CD4⁺CD8⁻ et de l'auto-immunité. Alors que CD95 a été impliqué dans un premier temps dans la contraction du nombre de lymphocytes T activés lors de la réponse anti-tumorale ou infectieuse, il semble en fait jouer un rôle dans la tolérance périphérique et l'élimination des lymphocytes activés de manière chronique par les antigènes du soi de faible affinité. Le ligand de CD95, le CD95L est exprimé à la surface des lymphocytes T activés et des cellules NK où il joue un rôle important dans l'élimination des cellules tumorales et infectées. L'engagement de CD95 par le CD95L déclenche l'activation de cystéine protéases appelées caspases. Une de ces caspases, la caspase-12 est retrouvée sous une forme longue (active et ancestrale) principalement dans certaines populations d'origine africaine et interviendrait dans l'atténuation de la réponse inflammatoire. La pression de sélection responsable de la conservation par ces populations de la forme longue de la caspase-12 reste à ce jour inconnue.

Summary

The death receptor CD95 belongs to the TNF (Tumor necrosis factor) receptor superfamily. Lpr and Lpr^{cg} mice or ALPS (autoimmune lymphoproliferative syndrome) type Ia-suffering patients exhibit mutated and non-functional CD95 alleles. The patients and the mice display similar phenotypes such as lymphoproliferation, adenopathy, splenomegaly, accumulation of double negative T lymphocytes (B220⁺CD4⁻CD8⁻) and the production of autoimmune antibodies. Although CD95 was initially involved in the elimination of lymphocytes T activated by tumoral or infectious antigens, recent studies highlighted that in fact CD95 plays a pivotal role in peripheral tolerance and the elimination of lymphocytes chronically stimulated by self-antigens. The cognate CD95 ligand, CD95L is expressed at the membrane of activated lymphocytes and natural killer cells upon which it plays a pivotal role in the elimination of transformed and infected cells. The engagement of CD95 leads to the activation of a family of cysteine proteases termed caspases and the subsequent induction of the apoptotic phenotype. Among these caspases, the caspase-12 has been found functional only in certain African population wherein it may play an essential role in the attenuation of the inflammatory response. To date, the pressure of selection responsible for the conservation of the long form of the caspase-12 in these populations remains unknown.

Introduction:

Le système immunitaire est un système composite intégrant plusieurs types de réponse permettant de maintenir l'intégrité de l'organisme. Lorsque celle-ci est menacée par un envahisseur intérieur (cellule tumorale) ou extérieur (micro-organisme pathogène), une réponse dite innée est initiée comme première ligne de défense déclenchée par des récepteurs de l'immunité innée dont certains sont solubles (*e.g.*, mannose-binding lectines, collectines) et d'autres exprimés au niveau de la cellule (récepteurs TLR (Toll-like receptors) et NLR (Nucleotide binding and oligamerization domain-like receptors ou NOD-like receptors). Ces récepteurs induisent une signalisation complexe aboutissant à la production d'une série "d'alarmines" et de cytokines pro-inflammatoires contribuant à créer un foyer inflammatoire pour contenir et éliminer l'intrus. A cette réponse innée est associée une réponse adaptative dans laquelle la réponse lymphocytaire T joue un rôle crucial. Celle-ci permet de seconder la réponse innée et de conserver la mémoire de cette réponse immune de façon à réagir plus efficacement lors d'une exposition secondaire.

Le CD95 et système immunitaire

CD95 (Fas/APO1) est un récepteur de mort qui appartient à la famille du récepteur au TNF (Tumor Necrosis Factor) et joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie du système immunitaire. CD95 est une protéine transmembranaire de type I qui renferme dans sa région intracellulaire un domaine dit de mort indispensable au déclenchement du signal apoptotique. CD95 joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie du système immunitaire. Chez l'homme, la présence d'une mutation germinale dans CD95, entraîne un syndrome lymphoprolifératif auto-immun ou ALPS (autoimmune lymphoproliferative syndrome) de type Ia [1-3]. Les symptômes observés chez ces patients sont des adénopathies, une hépato-splénomégalie, une augmentation importante de lymphocytes T double négatifs ($B220^+CD3^+CD4^-CD8^-$)

circulants, et parfois une auto-immunité. Par ailleurs, ces patients possèdent un risque accru de développer des lymphomes Hodgkinien et Non- Hodgkinien [4, 5]. Des symptômes similaires ont été observés chez deux souches murines appelées *lpr* (lymphoprolifération) et *lpr^{cg}*. Alors que la souche *lpr* possède un élément transposable (rétrovirus endogène) inséré dans l'intron 2 du CD95 qui abrège précocement la transcription du récepteur [6], les souris *lpr^{cg}* expriment un allèle CD95 muté dans le domaine de mort (isoleucine remplacée par une asparagine) entraînant une perte de fonction du récepteur [7]. Les études préliminaires réalisées à partir des sujets humains atteints d'ALPS de type Ia et de ces souches murines ont mis en évidence un rôle capital du récepteur CD95 dans la tolérance périphérique et la contraction de la réponse immune.

Deux signaux fournis par les cellules présentatrices de l'antigène sont nécessaires pour l'activation des lymphocytes T naïfs: l'un délivré par l'antigène via le récepteur T (TCR) et l'autre par les molécules de co-stimulation comme le CD28. Cette activation aboutit à la prolifération des lymphocytes T, l'élimination de la cellule infectée ou transformée puis la mort de ces lymphocytes (contraction) tandis que des cellules T mémoires persistent. Le récepteur de mort CD95 (Fas/Apo1) a été impliqué initialement dans la régulation négative des lymphocytes T activés par un processus cellulaire appelé AICD pour T cell-autonomous activation-induced cell death [8]. Des études récentes précisent qu'en fait, CD95 n'est pas responsable de l'élimination des lymphocytes T qui sont activés par des antigènes étrangers ou transformés possédant une forte affinité pour le TCR mais participe au processus d'AICD des lymphocytes T auto-immuns objet d'une activation chronique via les auto-antigènes de faibles affinités [9, 10]. La contraction de la réponse immune lors d'une infection ou d'une transformation cellulaire dépendrait de la présence de molécules de la famille de Bcl-2 possédant un domaine unique BH3 comme Bim [9]. Par ailleurs, si le symptôme lymphoprolifératif est dû à l'abrogation du signal CD95 dans les lymphocytes T ou B, la

maladie auto-immune est déclenchée par la perte du signal apoptotique CD95 dans les cellules présentatrices de l'antigène (CPA). En effet, les lymphocytes T activés exprimant le CD95L à leur surface exerceraient un rétro-contrôle négatif sur la réponse immune en éliminant les CPA activées qui sur-expriment CD95 [10]. La protéine p35 du baculovirus, un puissant inhibiteur de l'activité des caspases [11], prévient le signal apoptotique transmis par CD95. L'expression ectopique de p35 dans les cellules dendritiques (sous la dépendance du promoteur CD11c) augmente la demi-vie de ces cellules, entraîne leur accumulation et déclenche dans la souris une pathologie auto-immune. Au contraire l'expression de p35 uniquement dans les lymphocytes T est incapable de générer la production d'auto-anticorps par la souris [12]. Ces données indiquent que CD95 joue un rôle essentiel dans la prévention des processus auto-immuns en éliminant les cellules présentatrices de l'antigène.

Le Signal CD95

Alors que CD95 est exprimé de manière ubiquitaire, l'expression de son ligand naturel le CD95L, est restreinte aux lymphocytes T activés, aux cellules NK (Natural Killer) ainsi qu'à certaines régions du corps humain dites zones immuno-privilegiées comme l'œil [13], ou les testicules [14]. L'expression de CD95L dans ces régions anatomiques interdit l'accès du système immunitaire et ainsi protège de toute réponse inflammatoire qui pourrait avoir des conséquences désastreuses. Une expression *de novo* du CD95L a été observée dans les cellules tumorales traitées par certains agents anti-tumoraux [15]. Ainsi certains traitements anti-cancéreux élimineraient par suicide ou fratricide une partie des cellules malignes via l'induction de leur récepteur CD95. Lors de la fixation du CD95L, la modification de la conformation du domaine de mort du CD95 permet le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain) [16] qui à son tour, fixe et agrège une famille de cystéine protéases appelées les caspases et plus précisément les caspases initiateuses -8 et -10. Le complexe CD95/FADD/Caspase-8 et -10 est appelé DISC (Death Inducing Signaling

Complex) [17]. La concentration de ces caspases dans un espace restreint permet leur activation par auto-clivage, entraînant la libération de caspases actives dans le cytosol. Ces caspases clivent alors les caspases dites exécutrices ou effectrices (caspases-3, -6, -7) et cette cascade de clivage déclenche un signal de mort irréversible dans la cellule [18]. La protéine c-FLIP (cellular-FADD-homologous ICE/CED-3-like protease inhibitory protein) provient de la duplication du gène de la caspase-8 [19]. Deux formes majoritaires de c-FLIP sont retrouvées dans la cellule et sont issues d'un épissage alternatif, la forme courte appelée c-FLIP_s, contient uniquement les deux death effector domains (DED) présents également dans les caspases-8 et -10 et essentiels pour la fixation à la protéine adaptatrice FADD. De son côté, la forme longue c-FLIP_L, renferme en plus un domaine caspase mais non fonctionnel car un résidu cystéine essentiel à l'activité catalytique est remplacé par une tyrosine. Ainsi c-FLIP entre en compétition avec les caspase-8 et -10 lors de la formation du DISC et ainsi module l'induction du signal apoptotique [19]. Il est à noter que les étapes qui précèdent la formation du DISC restent à ce jour très discutées [20]. Différents scénarios ont été décrits pour rendre compte de la formation du complexe multi-moléculaire DISC. Suite à la fixation du CD95L ou d'un anticorps agoniste, l'activation de la sphingomyélinase acide et la production de céramide [21], l'endocytose du récepteur et son rapprochement de substrats présents dans l'endosome précoce et/ou tardif [22], la palmitoylation de CD95 [23, 24] et sa redistribution dans les radeaux lipidiques [25-28] ont été suggérées comme des étapes essentielles à la formation du DISC et à l'induction du signal de mort. Il reste à définir si l'ensemble de ces mécanismes moléculaires interviennent dans la formation du DISC avec un ordre bien défini ou si seulement certains de ces processus sont requis en fonction du type cellulaire ou encore du contexte physiologique. En conclusion, de nombreux travaux restent à réaliser afin d'expliquer comment un récepteur dépourvu d'activité enzymatique recrute l'ensemble des facteurs essentiels à l'activation des caspases.

Le feuillet externe de la membrane cytoplasmique est décrit comme une structure hétérogène composée d'une phase fluide dans laquelle flottent des domaines plus compacts enrichis en cholestérol, sphingolipides et en protéines de signalisation. Ces structures protéolipidiques sont couramment appelées radeaux lipidiques ou microdomaines résistants aux détergents (detergent-resistant membrane, DRMs). Le diamètre de ces domaines a été estimé entre 25 et 150 nm [29]. Certains signaux, encore mal définis, favorisent l'agrégation de ces radeaux lipidiques qui forment alors des plateformes atteignant des tailles de l'ordre du micromètre et ces structures jouent un rôle capital dans l'activation des lymphocytes T [30] ou des lymphocytes B [31]. Récemment nous avons montré que la redistribution forcée de CD95 dans les radeaux lipidiques amplifie le signal apoptotique et sensibilise à la mort des lignées cellulaires d'origine tumorale [27, 32].

L'IL-2 produite lors de l'activation lymphocytaire entraînerait une diminution de l'expression de c-FLIP, qui serait responsable de la sensibilisation au signal CD95 du lymphocyte T activé et donc du processus d'AICD [33]. Cependant une autre hypothèse a été récemment mise en avant pour expliquer l'élimination des lymphocytes T activés de manière clonogénique. Lors de l'activation du lymphocyte T, CD95 se redistribue dans les radeaux lipidiques de manière indépendante de l'expression du CD95L et cette relocalisation sensibilise de manière dramatique la cellule au signal apoptotique CD95 [32]. Ainsi la délétion clonale des lymphocytes T activés par leur antigène va dépendre d'une réorganisation de la localisation au niveau de la membrane plasmique du CD95. A ce jour, les mécanismes moléculaires responsables de la redistribution de CD95 dans les microdomaines puis de l'amplification du signal apoptotique restent à découvrir. Récemment, nous avons montré que la voie de signalisation anti-apoptotique Phosphatidylinositol 3-phosphate Kinase (PI3K) était impliquée dans le maintien de CD95 hors des radeaux lipidiques [25]. En effet, l'inhibition de PI3K par des inhibiteurs pharmacologiques entraîne la redistribution rapide de CD95 dans les

radeaux lipidiques et l'induction du signal apoptotique. Cette voie PI3K est activée précocement dans les lymphocytes T activés lors de la présentation de l'antigène par les CPA et elle est essentielle pour protéger le lymphocyte d'une mort apoptotique prématurée [34]. De notre côté, nous observons l'inhibition de cette voie lors de la stimulation répétée du lymphocyte T activé qui subit alors l'AICD (Bénéteau M et Legembre P, résultats non publiés). En conclusion, il est possible que cette voie de signalisation PI3K activée dans le lymphocyte T lors de la présentation antigénique protège la cellule du signal apoptotique CD95 en maintenant le récepteur en dehors des radeaux lipidiques.

Les Caspases

La famille de protéases appelée caspase (cysteine aspartyl-specific proteases) a été décrite à l'origine comme essentielle pour le clivage et la sécrétion de l'Interleukine 1- β [35, 36]. Le rôle des caspases dans la transmission du signal apoptotique fut démontré plus tardivement, et a été depuis intensivement étudié [37, 38]. Ces protéases reconnaissent une séquence de quatre acides aminés et clivent directement après un acide Aspartique (Asp). Les caspases sont générées sous forme de zymogènes et leur clivage protéolytique est nécessaire à leur activation.

Récemment, en plus de leur rôle dans la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (*e.g.*, IL-1, IL-18) et dans la propagation du signal apoptotique, plusieurs fonctions non-apoptotiques ont été attribuées aux caspases. Par exemple, la caspase-8 participe à l'activation du facteur NF- κ B, lors de la stimulation du Toll Like Receptor-4 (TLR-4) et du récepteur des lymphocytes T (TCR) [39]. Des données *in vitro* ont montré que les caspases -8, -3, -6, et -7 étaient importantes pour la prolifération lymphocytaire [40]. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* par l'observation de modèles murins déficients pour l'expression de ces caspases [41] et dans certains cas d'ALPS chez l'homme [42]. En effet, la déplétion sélective de la caspase-8

au niveau des lymphocytes T chez la souris, ou la présence d'une mutation de la caspase-8 chez l'Homme entraînent une immunodéficience liée à un défaut d'activation et de prolifération des lymphocytes T.

La localisation intracellulaire des caspases contribue également à leur spécificité. Il a été démontré chez la souris que la caspase-12 principalement localisée dans le réticulum endoplasmique (RE) jouait un rôle dans l'apoptose déclenchée par les stress du RE [43]. Cependant chez l'Homme, le rôle de cette caspase-12 dans l'apoptose reste controversé [44].

La Caspase-12

La caspase-12, de par sa structure et sa localisation chromosomique appartient à la famille des caspases dites inflammatoires incluant notamment la caspase -1, -4 et -5 [45]. Ces dernières font parties du complexe connu sous le nom "d'inflammasome" et sont essentielles à la maturation de cytokines pro-inflammatoires associées à la réponse innée [46]. A la différence de la souris, la plupart des individus de la population caucasienne porte un gène codant pour une caspase inactive (courte) en raison d'une mutation entraînant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop précoce. Ceci conduit à une forme tronquée (CASP12-S) ne possédant pas le domaine protéase et excluant de ce fait un rôle comme médiateur de l'apoptose chez l'homme. La découverte par Saleh *et al.*, de l'existence d'une forme longue Casp12-L, chez certaines populations africaines, a fourni un contexte idéal pour examiner le rôle de cette caspase chez l'Homme [47]. En analysant *in vitro* la réponse inflammatoire déclenchée par le LPS (lipopolysaccharide), ces mêmes auteurs ont montré une réponse atténuée chez les porteurs de la forme longue comparée à la forme courte [48]. En revanche, aucune différence de sensibilité aux agents apoptotiques n'a été détectée entre les différents groupes, qu'il s'agisse de stimuli de la voie extrinsèque (CD95) ou d'inducteurs du stress du réticulum endoplasmique [48]. Ces travaux ont conduit à proposer un nouveau rôle

pour la caspase-12, celui d'atténuateur de la réponse pro-inflammatoire. Une étude portant sur une population d'Américains d'origine Africaine souffrant de sepsis a montré une fréquence augmentée du génotype Casp12-L indiquant que la forme longue augmenterait la susceptibilité au sepsis lors d'infections bactériennes [47]. Par la suite la même équipe a montré que l'invalidation du gène de la caspase-12 chez des souris leur conférait une résistance accrue à la péritonite et au choc septique lié à une meilleure capacité de clairance des bactéries [48]. Ces souris déficientes montrent par ailleurs une capacité de production accrue d'IL-1 β et d'IL-18 par rapport aux souris sauvages. Ces résultats complètent les observations faites chez l'Homme qui confirment le rôle de la forme longue de la caspase-12 dans l'atténuation de la réponse inflammatoire, ce qui entraîne un effet délétère sur l'élimination bactérienne et la sensibilité au sepsis. L'effet inhibiteur de la caspase-12 sur la production d'IL-1 β est indépendant de son activité enzymatique puisqu'une mutation de la cystéine dans le site catalytique ne modifie pas cette fonction [48]. Ceci n'est pas sans rappeler l'effet inhibiteur de c-FLIP, molécule structuralement proche de la caspase-8 mais dépourvue d'activité enzymatique, sur la « voie extrinsèque » induite par CD95 que nous avons décrit précédemment. Ainsi la caspase-12 pourrait donc être l'équivalent de c-FLIP dans la régulation de la cascade des caspases inflammatoires.

L'intérêt de la caspase-12 comme atténuateur de la réponse inflammatoire anti-bactérienne a conduit à faire des études plus extensives concernant la distribution des formes actives en étudiant le génotype de plus de mille individus provenant de 52 populations différentes situées en Amérique, Europe, Afrique et Asie. Le gène codant pour la forme longue est retrouvé de manière prédominante en Afrique sub-saharienne avec une fréquence moyenne de 28%. Chez les Pygmés Mbuti (République Démocratique du Congo) ou les San (Namibie) cette fréquence atteint respectivement 60% et 57%. Hors Afrique, l'allèle caspase-12L est non détectable dans la plupart des populations. L'impressionnante extension à travers

le monde de l'allèle codant pour la forme courte serait le résultat d'une pression de sélection positive conférant aux populations un avantage par résistance au sepsis. Pourquoi certaines populations Africaines ont gardé la forme active ancestrale ? Une des hypothèses serait que l'avantage sélectif ne s'exprimerait que lorsque la population atteindrait une densité critique augmentant la fréquence de maladies infectieuses notamment bactériennes [49].

En conclusion, ce survol de la signalisation impliquant CD95 ou la caspase-12 a permis de mettre en évidence un certain parallélisme entre ces deux voies de signalisation (régulation de l'activité des caspases par les pseudo-caspases c-FLIP ou Casp12-L). De l'étude détaillée des mécanismes moléculaires impliqués dans les signaux CD95 et caspase-12 pourrait naître dans le futur de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'améliorer la réponse immunitaire responsable de l'élimination des cellules tumorales ou infectieuse.

Remerciements : Ce travail a été supporté par des financements provenant de l'Agence de Biomédecine, l'Agence Nationale de la Recherche (JC07_183182), la Ligue Contre le Cancer (Comité de la Dordogne) et la Fondation de France (Leucémie). Remerciements à JF-Moreau pour ses remarques sur la forme et le fond de cette revue.

Références

- 1 Drappa, J., Vaishnaw, A. K., Sullivan, K. E., Chu, J. L. and Elkon, K. B. (1996) Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med.* **335**: 1643-1649.
- 2 Fisher, G. H., Rosenberg, F. J., Straus, S. E., Dale, J. K., Middleton, L. A., Lin, A. Y., Strober, W., Lenardo, M. J. and Puck, J. M. (1995) Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell.* **81**: 935-946.
- 3 Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I. A., Debatin, K. M., Fischer, A. and de Villartay, J. P. (1995) Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science.* **268**: 1347-1349.
- 4 Legembre, P., Barnhart, B. C., Zheng, L., Vijayan, S., Straus, S. E., Puck, J., Dale, J. K., Lenardo, M. and Peter, M. E. (2004) Induction of apoptosis and activation of NF-kappaB by CD95 require different signalling thresholds. *EMBO Rep.* **5**: 1084-1089.
- 5 Straus, S. E., Jaffe, E. S., Puck, J. M., Dale, J. K., Elkon, K. B., Rosen-Wolff, A., Peters, A. M., Sneller, M. C., Hallahan, C. W., Wang, J., Fischer, R. E., Jackson, C. M., Lin, A. Y., Baumler, C., Siegert, E., Marx, A., Vaishnaw, A. K., Grodzicky, T., Fleisher, T. A. and Lenardo, M. J. (2001) The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood.* **98**: 194-200.
- 6 Adachi, M., Watanabe-Fukunaga, R. and Nagata, S. (1993) Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**: 1756-1760.
- 7 Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Nagata, S. (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature.* **356**: 314-317.
- 8 Nagata, S. and Golstein, P. (1995) The Fas death factor. *Science.* **267**: 1449-1456.
- 9 Hildeman, D. A., Zhu, Y., Mitchell, T. C., Bouillet, P., Strasser, A., Kappler, J. and Marrack, P. (2002) Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity.* **16**: 759-767.
- 10 Stranges, P. B., Watson, J., Cooper, C. J., Choisy-Rossi, C. M., Stonebraker, A. C., Beighton, R. A., Hartig, H., Sundberg, J. P., Servick, S., Kaufmann, G., Fink, P. J. and Chervonsky, A. V. (2007) Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity.* **26**: 629-641.
- 11 Xu, G., Cirilli, M., Huang, Y., Rich, R. L., Myszk, D. G. and Wu, H. (2001) Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex. *Nature.* **410**: 494-497.
- 12 Chen, M., Wang, Y. H., Wang, Y., Huang, L., Sandoval, H., Liu, Y. J. and Wang, J. (2006) Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science.* **311**: 1160-1164.
- 13 Griffith, T. S., Brunner, T., Fletcher, S. M., Green, D. R. and Ferguson, T. A. (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science.* **270**: 1189-1192.
- 14 Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. and Nagata, S. (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell.* **75**: 1169-1178.
- 15 Friesen, C., Fulda, S. and Debatin, K. M. (1997) Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells. *Leukemia.* **11**: 1833-1841.
- 16 Scott, F. L., Stec, B., Pop, C., Dobaczewska, M. K., Lee, J. J., Monosov, E., Robinson, H., Salvesen, G. S., Schwarzenbacher, R. and Riedl, S. J. (2008) The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature.*
- 17 Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. and Peter, M. E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J.* **14**: 5579-5588.
- 18 Hengartner, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature.* **407**: 770-776.
- 19 Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E. and Tschopp, J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* **388**: 190-195.
- 20 Chaigne-Delalande, B., Moreau, J. F. and Legembre, P. (2008) Rewinding the DISC. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* **56**: 9-14.
- 21 Cremesti, A., Paris, F., Grassme, H., Holler, N., Tschopp, J., Fuks, Z., Gulbins, E. and Kolesnick, R. (2001) Ceramide enables fas to cap and kill. *J Biol Chem.* **276**: 23954-23961.
- 22 Lee, K. H., Feig, C., Tchikov, V., Schickel, R., Hallas, C., Schutze, S., Peter, M. E. and Chan, A. C. (2006) The role of receptor internalization in CD95 signaling. *Embo J.* **25**: 1009-1023.

- 23 Chakrabandhu, K., Herincs, Z., Huault, S., Dost, B., Peng, L., Conchonaud, F., Marguet, D., He, H. T. and Hueber, A. O. (2007) Palmitoylation is required for efficient Fas cell death signaling. *Embo J.* **26**: 209-220.
- 24 Feig, C., Tchikov, V., Schutze, S. and Peter, M. E. (2007) Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *Embo J.* **26**: 221-231.
- 25 Beneteau, M., Pizon, M., Chaigne-Delalande, B., Daburon, S., Moreau, P., De Giorgi, F., Ichas, F., Rebillard, A., Dimanche-Boitrel, M. T., Taupin, J. L., Moreau, J. F. and Legembre, P. (2008) Localization of Fas/CD95 into the Lipid Rafts on Down-Modulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway. *Mol Cancer Res.* **6**: 604-613.
- 26 Hueber, A. O., Bernard, A. M., Herincs, Z., Couzinet, A. and 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.
- 27 Legembre, P., Daburon, S., Moreau, P., Ichas, F., de Giorgi, F., Moreau, J. F. and Taupin, J. L. (2005) Amplification of Fas-mediated apoptosis in type II cells via microdomain recruitment. *Mol Cell Biol.* **25**: 6811-6820.
- 28 Legembre, P., Daburon, S., Moreau, P., Moreau, J. F. and Taupin, J. L. (2006) Cutting edge: modulation of fas-mediated apoptosis by lipid rafts in T lymphocytes. *J Immunol.* **176**: 716-720.
- 29 Thorn, H., Stenkula, K. G., Karlsson, M., Ortegren, U., Nystrom, F. H., Gustavsson, J. and Stralfors, P. (2003) Cell surface orifices of caveolae and localization of caveolin to the necks of caveolae in adipocytes. *Mol Biol Cell.* **14**: 3967-3976.
- 30 Viola, A. (2001) The amplification of TCR signaling by dynamic membrane microdomains. *Trends Immunol.* **22**: 322-327.
- 31 Guo, B., Kato, R. M., Garcia-Lloret, M., Wahl, M. I. and Rawlings, D. J. (2000) Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex. *Immunity.* **13**: 243-253.
- 32 Muppidi, J. R. and Siegel, R. M. (2004) Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. *Nat Immunol.* **5**: 182-189.
- 33 Kirchhoff, S., Muller, W. W., Krueger, A., Schmitz, I. and Krammer, P. H. (2000) TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol.* **165**: 6293-6300.
- 34 Jones, R. G., Elford, A. R., Parsons, M. J., Wu, L., Krawczyk, C. M., Yeh, W. C., Hakem, R., Rottapel, R., Woodgett, J. R. and Ohashi, P. S. (2002) CD28-dependent activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly. *J Exp Med.* **196**: 335-348.
- 35 Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T. A., March, C. J., Kronheim, S. R., Druck, T., Cannizzaro, L. A. and et al. (1992) Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science.* **256**: 97-100.
- 36 Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J. and et al. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature.* **356**: 768-774.
- 37 Cryns, V. and Yuan, J. (1998) Proteases to die for. *Genes Dev.* **12**: 1551-1570.
- 38 Thornberry, N. A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science.* **281**: 1312-1316.
- 39 Su, H., Bidere, N., Zheng, L., Cubre, A., Sakai, K., Dale, J., Salmena, L., Hakem, R., Straus, S. and Lenardo, M. (2005) Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science.* **307**: 1465-1468.
- 40 Alam, A., Cohen, L. Y., Aouad, S. and Sekaly, R. P. (1999) Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med.* **190**: 1879-1890.
- 41 Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P. Y., Berry, D. M., Tamblyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., Wakeham, A., Bouchard, D., Yeh, W. C., McGlade, J. C., Ohashi, P. S. and Hakem, R. (2003) Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev.* **17**: 883-895.
- 42 Chun, H. J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C. K., Siegel, R. M., Dale, J. K., Puck, J., Davis, J., Hall, C. G., Skoda-Smith, S., Atkinson, T. P., Straus, S. E. and Lenardo, M. J. (2002) Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature.* **419**: 395-399.
- 43 Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. and Yuan, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* **403**: 98-103.

- 44 Fischer, H., Koenig, U., Eckhart, L. and Tschachler, E. (2002) Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun.* **293**: 722-726.
- 45 Van de Craen, M., Vandenabeele, P., Declercq, W., Van den Brande, I., Van Loo, G., Molemans, F., Schotte, P., Van Crielinge, W., Beyaert, R. and Fiers, W. (1997) Characterization of seven murine caspase family members. *FEBS Lett.* **403**: 61-69.
- 46 Yu, H. B. and Finlay, B. B. (2008) The caspase-1 inflammasome: a pilot of innate immune responses. *Cell Host Microbe.* **4**: 198-208.
- 47 Saleh, M., Vaillancourt, J. P., Graham, R. K., Huyck, M., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Steinberg, M. H., Nolan, V., Baldwin, C. T., Hotchkiss, R. S., Buchman, T. G., Zehnbaue, B. A., Hayden, M. R., Farrer, L. A., Roy, S. and Nicholson, D. W. (2004) Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature.* **429**: 75-79.
- 48 Saleh, M., Mathison, J. C., Wolinski, M. K., Bensinger, S. J., Fitzgerald, P., Droin, N., Ulevitch, R. J., Green, D. R. and Nicholson, D. W. (2006) Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature.* **440**: 1064-1068.
- 49 Xue, Y., Daly, A., Yngvadottir, B., Liu, M., Coop, G., Kim, Y., Sabeti, P., Chen, Y., Stalker, J., Huckle, E., Burton, J., Leonard, S., Rogers, J. and Tyler-Smith, C. (2006) Spread of an inactive form of caspase-12 in humans is due to recent positive selection. *Am J Hum Genet.* **78**: 659-670.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.ejconline.com

Cisplatin-induced apoptosis involves a Fas-ROCK-ezrin-dependent actin remodelling in human colon cancer cells

Amélie Rebillard ^{a,c}, Sandrine Jouan-Lanhouet ^a, Elodie Jouan ^a, Patrick Legembre ^a,
Mathieu Pizon ^b, Odile Sergent ^a, David Gilot ^a, Xavier Tekpli ^a,
Dominique Lagadic-Gossmann ^a, Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel ^{a,*}

^a EA 4427 SeRAIC, Faculty of Pharmacy, University of Rennes 1, IFR 140 GFAS, Rennes F-35043, France

^b CNRS UMR 5164, University of Bordeaux 2, Bordeaux F-33076, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2009

Received in revised form 20 January 2010

Accepted 26 January 2010

Available online 4 March 2010

Keywords:

Cisplatin

Fas

RhoA-GTP

ROCK

Ezrin

Actin cytoskeleton

Membrane fluidity

Colon cancer

Lipid rafts

RNA interference

ABSTRACT

In human colon cancer cells, cisplatin-induced apoptosis involves the Fas death receptor pathway independent of Fas ligand. The present study explores the role of ezrin and actin cytoskeleton in relation with Fas receptor in this cell death pathway. In response to cisplatin treatment, a rapid and transient actin reorganisation is observed at the cell membrane by fluorescence microscopy after Phalloidin-FITC staining. This event is dependent on the membrane fluidification studied by electron paramagnetic resonance and necessary for apoptosis induction. Moreover, early after the onset of cisplatin treatment, ezrin co-localised with Fas at the cell membrane was visualised by membrane microscopy and was redistributed with Fas, FADD and procaspase-8 into membrane lipid rafts as shown on Western blots. In fact, cisplatin exposure results in an early small GTPase RhoA activation demonstrated by RhoA-GTP pull down, Rho kinase (ROCK)-dependent ezrin phosphorylation and actin microfilaments remodelling. Pretreatment with latrunculin A, an inhibitor of actin polymerisation, or specific extinction of ezrin or ROCK by RNA interference prevents both cisplatin-induced actin reorganisation and apoptosis. Interestingly, specific extinction of Fas receptor by RNA interference abrogates cisplatin-induced ROCK-dependent ezrin phosphorylation, actin reorganisation and apoptosis suggesting that Fas is a key regulator of cisplatin-induced actin remodelling and is indispensable for apoptosis. Thus, these findings show for the first time that phosphorylation of ezrin by ROCK via Fas receptor is involved in the early steps of cisplatin-induced apoptosis.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cisplatin or cis-diamminedichloroplatinum II (CDDP) is one of the most known potent anticancer agents, displaying clinical activity against a variety of solid tumours. Platinum-DNA adducts, which are formed following the uptake of the drug into the cell nucleus, activate several signal transduction path-

ways and culminate in the activation of apoptosis.¹ However, the contributions of other DNA-independent targets, which have been so far underestimated, could also play an important role in cisplatin cytotoxicity.² Elucidating more thoroughly the cytotoxic mechanisms of cisplatin could be a benefit to refine anticancer therapeutic approaches based on this compound.

* Corresponding author. Address: EA 4427 SeRAIC, Université de Rennes 1, Faculté de Pharmacie, 2 Av du Pr Léon Bernard, Rennes F-35043, France. Tel.: +33 223234837; fax: +33 223234794.

E-mail addresses: marie-therese.boitrel@univ-rennes1.fr, marie-therese.boitrel@rennes.inserm.fr (M.-T. Dimanche-Boitrel).

^c New address: Laboratoire Physiologie M2S, UFR-APS, Université de Rennes 2, Campus La Harpe, Avenue Charles Tillon, Rennes F-35044, France.

0959-8049/\$ - see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.ejca.2010.01.034

Cisplatin-induced cell death implicates both Fas receptor-dependent pathway and mitochondria-dependent pathway. We have previously shown that exposure of HT29 or HCT116 human colon cancer cells to cisplatin induces Fas receptor clustering and activation in a ligand-independent manner.³ The type I transmembrane protein Fas (CD95/Apo-1) triggers apoptosis in a variety of cell types. Upon engagement, the Fas-associated death domain protein (FADD) and procaspase-8 are rapidly recruited to the intracellular death domain of Fas receptor, forming the Death-Inducing Signalling Complex (DISC), which then leads to activation of a caspase cascade and irreversible apoptosis.⁴ Recent studies have shown that apoptosis induced by Fas agonists or chemotherapeutic agents involves the aggregation of the Fas receptor into membrane lipid rafts enriched in cholesterol and sphingolipids.^{5–9} Moreover, actin cytoskeleton is involved in Fas-mediated apoptosis, regulating Fas clustering and internalisation^{10–12} with a recent demonstration of a key role of RhoA-ROCK-dependent ezrin-radixin-moesin phosphorylation in this cell death pathway.¹³

Actin cytoskeleton is central in the regulation of membrane-associated signalling and membrane trafficking. The ezrin-radixin-moesin (ERM) family proteins constitute the link between plasma membrane proteins and actin cytoskeleton. Among them ezrin has been shown to be involved in Fas-mediated apoptosis.¹²

More recently, we have demonstrated that cisplatin induces a rapid inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger-1 (NHE1), leading to intracellular acidification which promotes acid sphingomyelinase activation, ceramide generation, membrane fluidification and Fas aggregation into lipid rafts.¹⁴ The present study further explores this cascade by evaluating the role of ezrin and actin cytoskeleton in cisplatin-induced apoptosis. We show for the first time that cisplatin induces actin cytoskeleton reorganisation, which depends on membrane fluidification. Concomitantly, cisplatin induces ezrin phosphorylation through ROCK, and co-localisation of Fas receptor with ezrin at the cell membrane of HT29 cells. All these events are dependent on Fas. Altogether, these data suggest for the first time that Fas receptor triggering is indispensable for actin microfilament rearrangement during cell death induced by cisplatin in human colon cancer cells.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Cisplatin (CDDP) was from Merck, latrunculin A (LTN A) and water-soluble cholesterol (CHOL) were from Sigma-Aldrich. Rho inhibitor (Rho Inh) was from Cytoskeleton, Hoechst 33342 and fluorescein-tagged phalloidin (Phalloidin-FITC) were from Molecular Probes.

2.2. Cell culture and treatments

HT29, HCT116 and SW480 human colon carcinoma cell lines (American Tissue Culture Collection, Biovalley) were cultured in Eagle's minimum essential medium (Eurobio) complemented with 10% foetal calf serum (FCS) (v/v) (GibcoBRL) and 2 mM L-glutamine (GibcoBRL). For all experiments, the cells,

growing in exponential phase, were treated with 25 μ M CDDP for different times. When indicated, the cells were pre-treated for 2 h or overnight with various chemical compounds.

2.3. Cell death assays

2.3.1. Hoechst staining

Apoptotic index was measured as previously described.¹⁴ At least three independent experiments were performed per inhibitor tested.

2.3.2. Caspase-3 activity

Caspase-3 activity was measured using the substrate DEVD-AMC (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AMC; Calbiochem) as previously described.¹⁴ Three experiments were performed in triplicate for each experimental condition tested.

2.4. Determination of membrane fluidity by EPR spin-labelling method

The membrane fluidity of cells was determined by a spin-labelling method using electron paramagnetic resonance (EPR) as previously described.¹⁴ A decrease in the membrane order parameter *S* reflects an increase in the membrane fluidity.

2.5. Analysis of F-actin labelling

After treatment, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 20 min, washed in PBS 1X and then preincubated with PBS-BSA 2% (w/v)-saponin 0.2% (w/v) for 30 min before staining with fluorescein-tagged phalloidin (Phalloidin-FITC) (1:500, Sigma) for 30 min. The samples were viewed using a fluorescent DMRXA2 Leica microscope with a 40 $\times$ NA 1.32 lens equipped with standard fluorescent filters. The images of F-actin were acquired with a CoolSNAP ES camera using MetaMorph software.

2.6. Immunofluorescence microscopy analysis

After treatment, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 15 min, washed in PBS 1X and then preincubated with PBS-BSA 2% (w/v)-saponin 0.2% (w/v) for 30 min before incubation for 2 h with either polyclonal rabbit IgG anti-Fas (1:100, AbCam), mouse monoclonal IgG anti-ezrin (1:100, Biogenesis), or isotype-matched controls. The cells were then washed in PBS and stained for 45 min with TRITC-labelled goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) or FITC-labelled goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories). The fluorescent images of ezrin and Fas stainings were analysed using a DMRXA Leica microscope, a COHU high performance CCD camera and the metavue software. A Z-series of images has been taken after image acquisition.

2.7. Isolation of membrane microdomains

The membrane microdomains of HT29 cells were isolated as previously described.⁸ After ultracentrifugation, 1 mL fractions were collected from the top of the gradient. Measurement of cholesterol content was performed with Infinity cholesterol

kit (Kodak ECL Plus) on each fraction of the gradient. To determine the expression of Fas, FADD, and procaspase-8 and ERM, 40 μ L of each fraction were subjected to SDS-PAGE and immunoblot analysis. After blocking for 1 h at room temperature with 5% (w/v) powdered skimmed milk in Tris-buffered saline/Tween [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl and 0.1% Tween 20 (v/v)], the membranes were incubated with an anti-Fas rabbit polyclonal antibody (1:500 dilution; Santa Cruz Biotechnology), an anti-FADD monoclonal antibody (1:1000 dilution; Transduction Laboratories), an anti-procaspase-8 monoclonal antibody (1:1000 dilution; Immunotech), an anti-ERM polyclonal antibody (1:500; Cell Signalling), or an anti-flotillin-1 monoclonal antibody (1:500; Transduction Laboratories), an anti-TNFR1 monoclonal antibody (1:1000; Santa Cruz) and an anti-CD71 polyclonal antibody (1:1000; Santa Cruz). The membranes were then washed twice with Tris-buffered saline/Tween and incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) before protein identification using an enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham).

2.8. Cell transfection with siRNA

500,000 HT29 cells were transfected with either non-specific siRNA NTS1 (Non-targeting siRNA1, Dharmacon) or siRNA Fas (siGenome Smart Pool siRNA, gene ID 355, Dharmacon) or siRNA ezrin (siGenome Smart Pool siRNA, gene ID 7430, Dharmacon) or siRNA ROCK (siGenome Smart Pool siRNA, gene ID 6093, Dharmacon) by using Dharmafect-4 reagent (Dharmacon) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 100 nM siRNA (in 800 μ L Dharmafect-4) was applied in a volume of 800 μ L opti-MEM (GibcoBRL) on HT29 cells. For Western-blot analysis, the cells were harvested 48 h after transfection. For cell death experiment, following a 48 h transfection period, the cells were treated with 25 μ M cisplatin for 48 h.

2.9. Western-blot analysis

After treatment, the cells were lysed as previously described.¹⁴ Proteins (50 μ g) were separated on a polyacrylamide sodium dodecylsulphate-containing gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham). After blocking non-specific binding sites for 1 h at room temperature by 5% (w/v) skimmed milk in TPBS (PBS with 0.1% Tween 20 (v/v)), the membranes were incubated for 2 h at room temperature with a rabbit polyclonal anti-Fas antibody (1:500, Santa Cruz), a mouse monoclonal IgG1 anti-Thr567 phospho-ezrin (1:200, Pharmingen), a mouse monoclonal IgG1 anti-ezrin (1:500, Biogenesis), a mouse monoclonal IgG1 anti-ROCK (1:500, Santa Cruz) or a mouse monoclonal IgG2a anti-Hsc70 (1:1000, Santa Cruz). The membranes were then washed twice with TPBS and incubated for 1 h with peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibodies or goat anti-rabbit antibodies. Revelation was performed by chemiluminescence.

2.10. RhoA-GTP pull down

RhoA-GTP levels were measured using the RhoA activation assay kit from Cytoskeleton. Briefly, the cells were rapidly

lysed at 4 °C and incubated with Rhotekin-RBD affinity beads to specifically pull down RhoA-GTP. After washing, RhoA levels were quantified by running bead/protein complexes in Laemmli buffer containing 0.1 M DTT and probing with a mouse monoclonal anti-RhoA (1:500) as recommended by the manufacturer's instructions. Revelation was performed by chemiluminescence.

2.11. RhoA activation assay

To measure RhoA activation, the G-LISA™ activation kit (Kit# BK124, Cytoskeleton) was used according to the manufacturer's instructions. This assay uses a Rho-GTP-binding protein linked to the wells of a 96-well plate. Active, GTP-bound Rho in cell lysates binds to the wells while inactive, GDP-bound Rho is removed during wash steps. Bound GTP-Rho is detected by incubation with a RhoA-specific antibody followed by a secondary antibody conjugated to HRP and a detection reagent. The signal was read by measuring absorbance at 490 nm using a microplate reader (VersaMax, Molecular Devices).

2.12. Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using the unilateral student's t-test considering the variances as unequal. The significance is shown as follows: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

3. Results

3.1. Cisplatin treatment induces a rapid membrane fluidification-dependent actin cytoskeleton reorganisation which is involved in the related apoptosis

Cisplatin-induced rapid and transient changes in actin organisation with actin polarisation at the edge of the cells or between cell-cell contacts. Actin remodelling was detectable as soon as 30 min and persisted 6 h after cisplatin treatment (Fig. 1A).

Recently, we have shown that cisplatin induced a rapid plasma membrane fluidification, dependent on both NHE1 exchanger and acid sphingomyelinase, and which is required for cisplatin-induced Fas receptor activation in HT29 cells.^{8,14} In an attempt to order the early plasma membrane events that occur upon cisplatin exposure, we studied the involvement of plasma membrane fluidification in actin cytoskeleton reorganisation. The results revealed that pretreatment of HT29 cells with LTN A, an agent known to inhibit actin polymerisation, did not modify cisplatin-induced increase in membrane fluidity (as visualised by the decrease of membrane order parameter) (Fig. 1B). However, pretreatment of cells with 30 μ g/mL cholesterol (CHOL), a membrane-stabilising agent, inhibited this increase (Fig. 1B). Moreover, pretreatment with CHOL prevented the observed actin reorganisation (Fig. 1C), suggesting that cisplatin-induced actin remodelling depends on the membrane fluidification.

Pretreatment with LTN A significantly inhibited cisplatin-induced apoptosis as evidenced by the decreased percentage of fragmented and condensed nuclei in HT29 cells treated with CDDP-LNTA (~25%) in comparison with the percentage

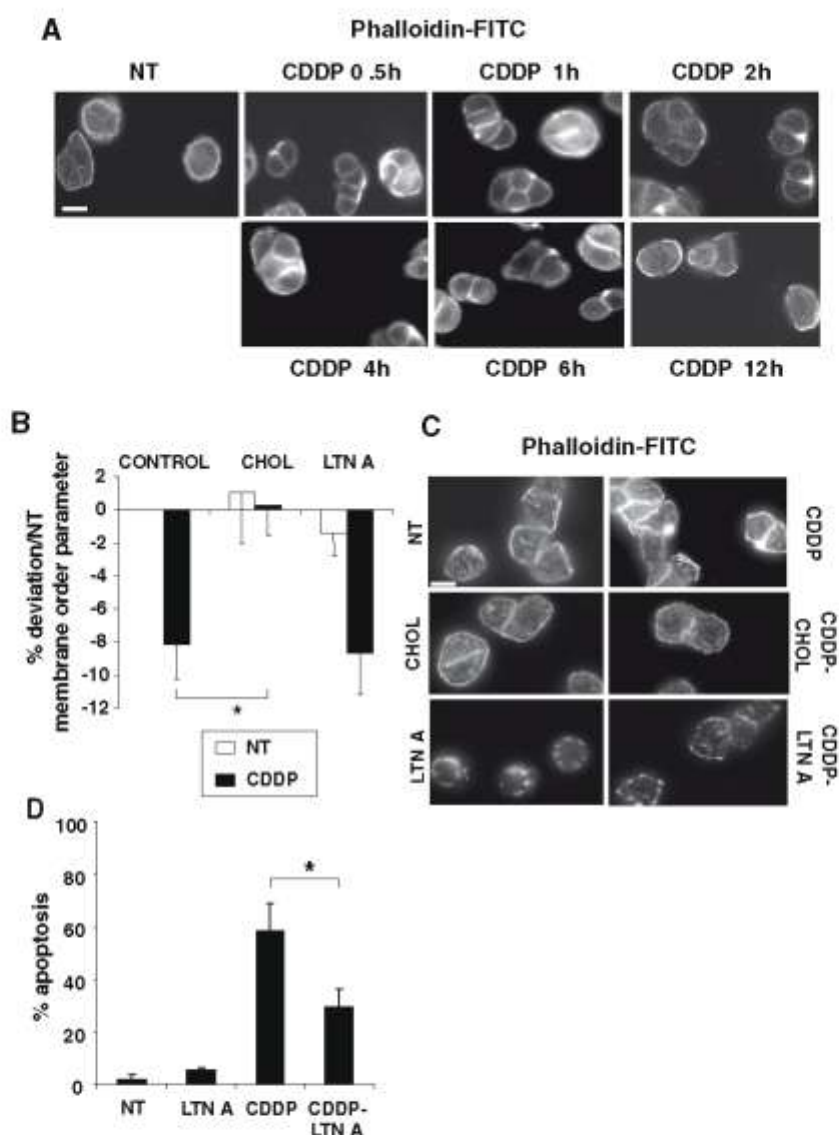


Fig. 1 – Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification-dependent actin reorganisation. (A) Cisplatin treatment reorganises actin cytoskeleton. HT29 cells were treated or not (NT) with 25 μ M cisplatin (CDDP) for the indicated times. Actin microfilaments were evidenced by fluorescence microscopy using Phalloidin-FITC labelling of F-actin. One representative of three independent experiments is shown. Bars, 10 μ M. (B) Pre-treatment with cholesterol but not with latrunculin A inhibits cisplatin-induced increase in membrane fluidity. HT29 cells were pre-treated or not (CONTROL) with 30 μ g/mL cholesterol (CHOL) or 100 nM latrunculin A (LTN A) for 2 h, then left untreated or treated with 25 μ M CDDP for 1 h. Membrane fluidity was determined by electronic paramagnetic resonance (EPR) using a spin-labelling method. The EPR spectra were used to calculate the membrane order parameter S which is conversely proportional to membrane fluidity. Data are expressed as % deviation relatively to non-treated (NT) cells (mean $\pm$ SEM of three independent experiments). * $p \leq 0.05$, CHOL-CDDP versus CDDP. (C) Pre-treatment with cholesterol or latrunculin A prevents cisplatin-induced actin reorganisation. HT29 cells were pre-treated or not (NT) with 30 μ g/mL CHOL or 100 nM LTN A for 2 h, then left untreated or treated with 25 μ M CDDP for 2 h. Actin microfilaments were evidenced by fluorescence microscopy using Phalloidin-FITC staining as previously described. One representative of three independent experiments is shown. Bars, 10 μ M. (D) Pre-treatment with latrunculin A reduces cisplatin-induced apoptosis. HT29 cells were pre-treated or not (NT) with 100 nM LTN A for 2 h, then left untreated or treated with 25 μ M CDDP for 72 h. Percentages of apoptotic cells were estimated by nuclear chromatin staining with Hoechst 33342. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of three independent experiments. * $p \leq 0.05$, LTN A-CDDP versus CDDP.

of apoptotic cells in HT29 cells treated with CDDP (~60%) (Fig. 1D). These data indicate that cisplatin-induced actin cytoskeleton reorganisation significantly contributes to apoptosis induction.

3.2. Ezrin is involved in cisplatin-induced apoptosis and co-localises with Fas receptor

Recently, it has been proposed that Fas co-localisation with ezrin is an essential requirement for susceptibility to the Fas-mediated apoptosis.²⁵ By Western-blot analysis, we show that cisplatin induced a redistribution of ERM proteins into HT29 lipid rafts (fractions 1–7, enriched in cholesterol and characterised by flotillin-1 expression and by no expression of CD71), along with Fas, FADD and procaspase-8 (Fig. 2A). Interestingly, TNFR-1 was not redistributed into membrane lipid rafts after cisplatin treatment (Fig. 2A). Moreover, by fluorescence microscopy, a co-localisation of ezrin protein with Fas receptor was detected on the cell membrane of HT29 cells treated with cisplatin for 2 h (Fig. 2B). Finally, we used small interfering RNA (siRNA) targeting ezrin in order to evaluate the role of this protein in the cisplatin-induced apoptotic cascade. We observed that transient transfection with siRNA ezrin (siEzrin) inhibited the expression of ezrin protein (Fig. 2C, see inset) and reduced both cisplatin-induced apoptosis (Fig. 2C, left panel) and caspase-3 activation (Fig. 2C, right panel) by about 50% and 60%, respectively. Moreover, siRNA ezrin transfection inhibited cisplatin-induced actin reorganisation (Fig. 3). These results indicate that ezrin is involved in cisplatin-induced apoptosis and actin cytoskeleton reorganisation.

3.3. Cisplatin rapidly activates RhoA and induces ROCK-dependent phosphorylation of ezrin

Inactive ezrin protein resides in the cytoplasm of cells, whereas activated ezrin binds to the integral membrane proteins. Phosphorylation of a threonine residue (T567) within its C-terminal actin-binding domain is considered as a hallmark of ezrin activation. Moreover, the Rho family of GTPases¹⁶ has been shown to contribute to the activation of ERM.²⁷ In order to study the molecular mechanisms underlying ezrin activation after cisplatin treatment, we evaluated the effect of this anticancer drug on the levels of GTP-bound RhoA. Fig. 4A clearly indicates that cisplatin treatment increased the expression of RhoA-GTP within 15–60 min. We next studied the phosphorylation of ezrin on the T567 residue by Western-blot analysis. These experiments show that cisplatin induced a transient phosphorylation of ezrin from 30 to 60 min after the beginning of cisplatin treatment (Fig. 4B). The Rho kinase ROCK is a major target of the small GTP-binding protein RhoA and a key signalling molecule involved in ezrin phosphorylation and cytoskeleton reorganisation.¹⁵ Pretreatment of HT29 cells with a Rho inhibitor (Rho Inh) or transient transfection with siRNA ROCK (siROCK), which inhibited ROCK protein expression in HT29 cells (Fig. 4D, see inset), prevented cisplatin-induced ezrin phosphorylation (Fig. 4C). Moreover, transient transfection with siROCK inhibited cisplatin-induced apoptosis (Fig. 4D, left panel) and caspase-3 activation (Fig. 4D, right panel). These data strongly indicate

that cisplatin-induced apoptosis involves ezrin phosphorylation through a RhoA–ROCK-dependent pathway.

3.4. Fas is indispensable for ezrin phosphorylation and actin remodelling upon cisplatin treatment

We have previously shown that the Fas death receptor pathway was involved in cisplatin-induced apoptosis in human colon cancer cells.³ And it has been recently shown that phosphorylation of ezrin by ROCK was involved in the early steps of apoptotic signalling following Fas triggering.¹³ By using transient transfection with siRNA Fas, we confirm the role of Fas in cisplatin-induced apoptosis. The transient transfection with siRNA Fas (siFas) for 48 h strongly decreased the expression of Fas protein in HT29 cells (Fig. 5A, see inset) and significantly reduced cisplatin-induced apoptosis (Fig. 5A, left panel) and caspase-3 activation (Fig. 5A, right panel) by about 50% and 70%, respectively. Moreover, decreased expression of Fas by RNA interference inhibited cisplatin-induced RhoA activation (increased levels of GTP-bound RhoA) (Fig. 5B), cisplatin-induced ezrin phosphorylation (Fig. 5C) and actin reorganisation (Fig. 5D). These results suggest for the first time that cisplatin triggers ezrin phosphorylation and actin reorganisation via Fas receptor, these events being involved in cisplatin-induced apoptosis in HT29 human colon cancer cells.

3.5. Transient transfection with siRNA targeting Fas or ezrin inhibits cisplatin-induced apoptosis in two other human colon cancer cell lines, HCT116 and SW480

Transient transfections of HCT116 and SW480 with siRNA targeting Fas (siFas) and ezrin (siEzrin), respectively, significantly reduced cisplatin-induced apoptosis (Fig. 6), which corroborates the results obtained in HT29 cells. Collectively, these data suggest that Fas and ezrin might play a role in cisplatin-induced apoptosis in human colon cancer cells.

4. Discussion

In this study, we show for the first time that cisplatin treatment induces a rapid and transient reorganisation of F-actin microfilaments via Fas death receptor pathway in HT29 cells. Disruption of actin cytoskeleton with LTN A, a toxin isolated from a Red Sea sponge, completely inhibits cisplatin-induced actin microfilament rearrangement. LTN A also significantly reduces apoptosis indicating an important role of actin in cisplatin-induced apoptosis. These data are in agreement with the increasing literature on the involvement of actin cytoskeleton in early and late stages of apoptosis.^{29–31} In HT29 cells, we have previously shown that cisplatin-induced apoptosis involves plasma membrane fluidification independent of DNA adduct formation.³⁴ In order to study the role of membrane fluidity in cisplatin-induced actin polarisation, we used cholesterol, a membrane-stabilising agent, and found that actin reorganisation in HT29 cells was prevented under these conditions, thus suggesting that actin cytoskeleton rearrangement is dependent on membrane fluidification. Recently, Hannun's group has demonstrated that cisplatin

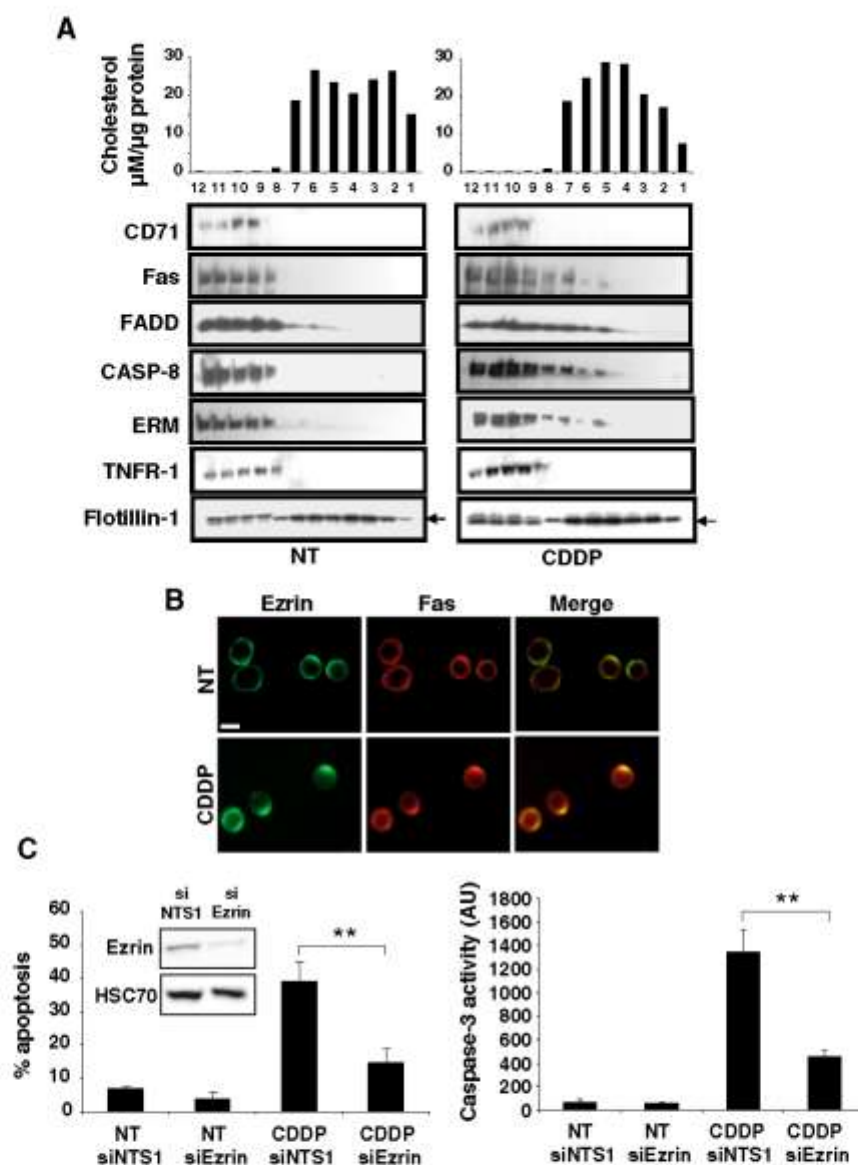


Fig. 2 – Ezrin is involved in cisplatin-induced apoptosis. (A) Cisplatin induces redistribution of ERM (Ezrin Radixin Moesin), Fas, Caspase-8 and FADD into lipid rafts of HT29 cells. HT29 cells were treated or not (NT) with 25 μM cisplatin (CDDP) for 6 h, then lysed in 1% Triton X-100 and fractionated on a linear sucrose density gradient by centrifugation. Cholesterol analysis was performed by a colorimetric assay using Infinity cholesterol kit (top). An equal volume of each collected fraction was submitted to SDS-PAGE before analysis of CD71, Fas, FADD, caspase-8, ERM, TNFR-1 and flotillin-1 expression by Western blot. One representative of three independent experiments is shown (bottom). (B) Cisplatin treatment induces co-localisation of ezrin with Fas receptor at the cell membrane. HT29 cells were treated or not (NT) with 25 μM CDDP for 2 h. Ezrin and Fas receptor expression were evidenced by fluorescence microscopy with an anti-ezrin antibody (Biogenesis) and an anti-Fas antibody (AbCam) staining. One representative of three independent experiments is shown. (C) Interfering with ezrin mRNA expression reduces cisplatin-induced apoptosis. HT29 cells were transiently transfected with siRNA ezrin (siEzrin) or siRNA NTS1 (siNTS1 used as a negative control). For Western-blot analysis (see inset), the cells were harvested 48 h after transfection. For cell death analysis, 48 h after cell transfection, HT29 cells were treated or not with 25 μM CDDP for 48 h. Percentages of apoptotic cells were estimated as in Fig. 1D. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of three independent experiments. $^{*}p < 0.01$, siEzrin-CDDP versus siNTS1-CDDP (left panel). Caspase-3 activation was measured in lysates by the cleavage of the DEVD-AMC peptide substrate. Data are expressed in arbitrary units (AU) as mean $\pm$ SEM of three independent experiments. $^{*}p < 0.01$, siEzrin-CDDP versus siNTS1-CDDP (right panel).

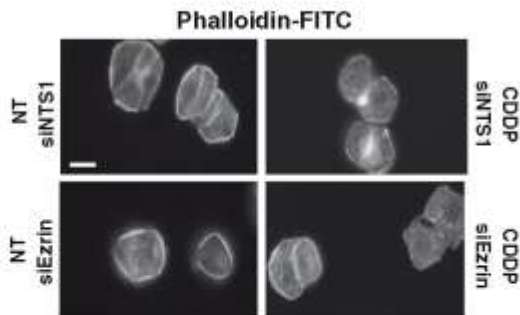


Fig. 3 – Interfering with Ezrin mRNA expression inhibits cisplatin-induced actin reorganisation. HT29 cells were transiently transfected with siRNA Ezrin (siEzrin) or siRNA NTS1 (siNTS1 used as a negative control). For fluorescence microscopy analysis, 48 h after cell transfection, HT29 cells were treated or not (NT) with 25 μ M cisplatin (CDDP) for 1 h. Actin microfilaments were evidenced by fluorescence microscopy using Phalloidin-FITC staining. Bars, 10 μ M. One representative of three independent experiments is shown.

induces actin remodelling via the acid sphingomyelinase/ceramide pathway in breast cancer cells.²² These results are in agreement with our present data showing that cisplatin-induced actin reorganisation in HT29 cells is dependent on the plasma membrane fluidification, an event that requires acid sphingomyelinase activation.¹⁴

Recently, it has been proposed that remodelling of actin cytoskeleton is mainly regulated by ERM proteins.²³ After cisplatin treatment, we demonstrate that ERM proteins as well as DISC components are redistributed into lipid rafts of HT29 cells and that Fas co-localises with ezrin on plasma membrane suggesting a possible interaction between Fas and ezrin. Such a molecular interaction has been previously demonstrated in human T lymphocytes.¹² In fact, a specific CD95-binding domain has been identified in the N-terminal region of ezrin, more precisely in the middle lobe of the ezrin FERM domain.²⁴ Further co-immunoprecipitation experiments will be necessary to confirm a Fas–ezrin interaction upon cisplatin treatment in HT29 human colon cancer cells. However, transient transfection with specific siRNA ezrin inhibits cisplatin-induced actin reorganisation and significantly reduces the related apoptosis, thus pointing to an important role for ezrin in cisplatin-induced apoptotic process.

In the cytoplasm, ezrin is maintained in an inactive conformation through an intramolecular interaction between their N-terminal and C-terminal domains. The activation of ezrin occurs through conformational changes triggered by events including the activation by Rho GTPases and the phosphorylation of a conserved threonine (T567) in the C-terminal domain (for review see)^{15,25} allowing its interaction with membrane proteins and F-actin.¹² Indeed, the Rho family may directly affect cell susceptibility to apoptosis by modulating the actin cytoskeleton.²⁶ In order to understand the origin of ezrin activation, we study the involvement of the small G protein RhoA that has been shown to be activated by Fas in Jurkat cells.¹³ Our present study demonstrates that cisplatin

induces an early and transient increase in the levels of GTP-bound RhoA, thus suggesting an activation of RhoA in our model. Different arguments support the idea that RhoA is a potent inducer of the serine/threonine kinase Rho kinase ROCK known to phosphorylate ezrin on the threonine 567 residue.²³ Accordingly, we show that cisplatin-induced ezrin phosphorylation is inhibited by pretreatment with a Rho inhibitor and is dependent on ROCK since transient transfection with specific siRNA ROCK totally prevents this event. Moreover, siRNA ROCK reduces by about 70% cisplatin-induced apoptosis, thus suggesting a major role for ROCK in this cell death pathway. Taken together, our data therefore suggest that cisplatin activates the RhoA–ROCK pathway, leading to ezrin phosphorylation, actin reorganisation and apoptosis. In another way, Hannun's group demonstrates that cisplatin induces actin remodelling through acid sphingomyelinase-dependent ezrin dephosphorylation, leading to a cytoplasmic localisation of this protein in MCF-7 breast cancer cells.²² The discrepancy between these data and our results could be explained by the difference between the cell types and by the involvement of the Fas death pathway in cisplatin-induced apoptosis in human HT29 colon cancer cells.^{3,8}

Cisplatin has been shown to bind to actin, leading to polymerisation alterations in a dose-dependent manner.²⁷ However, such a direct action is unlikely to occur under our experimental conditions since membrane fluidification, due to NHE1-dependent acid sphingomyelinase activation,¹⁴ was found to be necessary for cisplatin-induced actin reorganisation. Recent data have shown that Fas engagement leads to Rho GTPases family activation which in turn activates ROCK and triggers actin reorganisation.^{13,26,28} These results led us to investigate the involvement of this receptor in cisplatin-induced actin remodelling. We observe that transient transfection with specific siRNA Fas prevents cisplatin-induced increase in RhoA–GTP levels, actin reorganisation and ezrin phosphorylation and reduces both apoptosis and caspase-3 activation in HT29 cells by about 60%. This suggests for the first time that Fas receptor triggering is indispensable for actin microfilament rearrangement during cell death induced by cisplatin.

The exact role of actin in cisplatin-induced apoptosis requires definition. Recently, it has been shown that ezrin and actin were not required for Fas–rafts association but ezrin-mediated cytoskeleton association initiated receptor internalisation, a prerequisite step for the intracellular formation of DISC and apoptosis.²¹ Thus, actin cytoskeleton might be required for the intracellular amplification of Fas receptor signalling, through DISC formation, leading to cell death.

In summary, these results provide new insights into the molecular ordering of the early events that occur independent of DNA adduct formation in cisplatin-induced apoptosis. Cisplatin treatment increases membrane fluidity, then relocalises Fas receptor into lipid rafts and ceramide-enriched membrane domains and concomitantly phosphorylates ezrin via ROCK leading to F-actin reorganisation and apoptosis (Fig. 7).

In conclusion, several studies have shown that cisplatin-induced apoptosis depends not only on cisplatin interactions with DNA,¹ but also on interactions with mitochondrial DNA

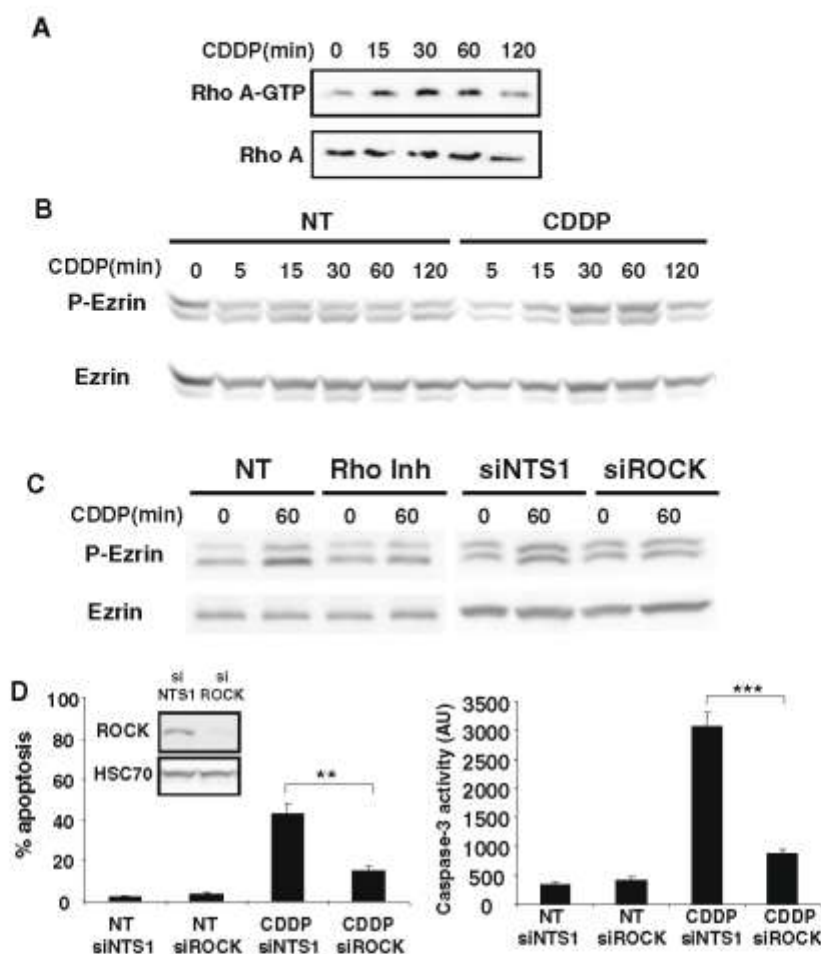


Fig. 4 – Cisplatin activates RhoA and induces ezrin phosphorylation on threonine 567 residue. (A) Cisplatin increases RhoA-GTP level in HT29 cells. HT29 cells were treated or not (0) with 25 μ M cisplatin (CDDP) for the indicated times. The GTP-binding fraction of RhoA was pulled down as described in Materials and Methods. The bead/protein complexes and whole-cell lysates were immunoblotted to detect RhoA level. Equal gel loading and transfer efficiency were checked by protein hybridisation with anti-RhoA antibody. One representative of three independent experiments is shown. (B) Cisplatin induces a transient phosphorylation of ezrin. HT29 cells were treated or not with 25 μ M CDDP for the indicated times. Phosphorylation of ezrin (P-Ezrin) was studied by Western-blot analysis using a mouse monoclonal anti-phospho-ezrin (Thr567). Ezrin expression was used as a loading control. One representative of three independent experiments is shown. (C) RhoA-ROCK-dependent ezrin phosphorylation is involved in cisplatin-induced apoptosis. HT29 cells were pre-treated or not (NT) with 0.1 μ g/ml Rho Inh overnight, then left untreated or treated with 25 μ M CDDP for 60 min. HT29 cells were transiently transfected with siRNA ROCK (siROCK) or siRNA NTS1 (siNTS1 used as a negative control). 48 h after cell transfection, HT29 cells were treated or not (NT) with 25 μ M CDDP for 60 min. Phospho-ezrin expression was evidenced by Western-blot analysis as previously described in (B). One representative of three independent experiments is shown. (D) Interfering with ROCK mRNA expression significantly inhibits cisplatin-induced apoptosis. HT29 cells were transiently transfected with siRNA ROCK (siROCK) or siRNA NTS1 (siNTS1 used as a negative control). For Western-blot analysis (see inset), the cells were harvested 48 h after transfection. For cell death analysis, 48 h after cell transfection, HT29 cells were treated or not with 25 μ M CDDP for 48 h. Percentages of apoptotic cells were estimated as in Fig. 1D. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of three independent experiments. $^{**}p \leq 0.01$, siROCK-CDDP versus siNTS1-CDDP (left panel). Caspase-3 activation was measured as in Fig. 2C. Data are expressed in arbitrary units (AU) as mean $\pm$ SEM of three independent experiments. $^{***}p \leq 0.001$, siROCK-CDDP versus siNTS1-CDDP (right panel).

and voltage-dependent anion channels in the mitochondrial membrane.²⁹ More recently, our group has found that the exchanger Na^+/H^+ (NHE1) is another potential target for cis-

platin cytotoxicity at the plasma membrane.³⁴ We now demonstrate that F-actin cytoskeleton reorganisation via Fas death pathway is also critical for cisplatin-induced apoptosis.

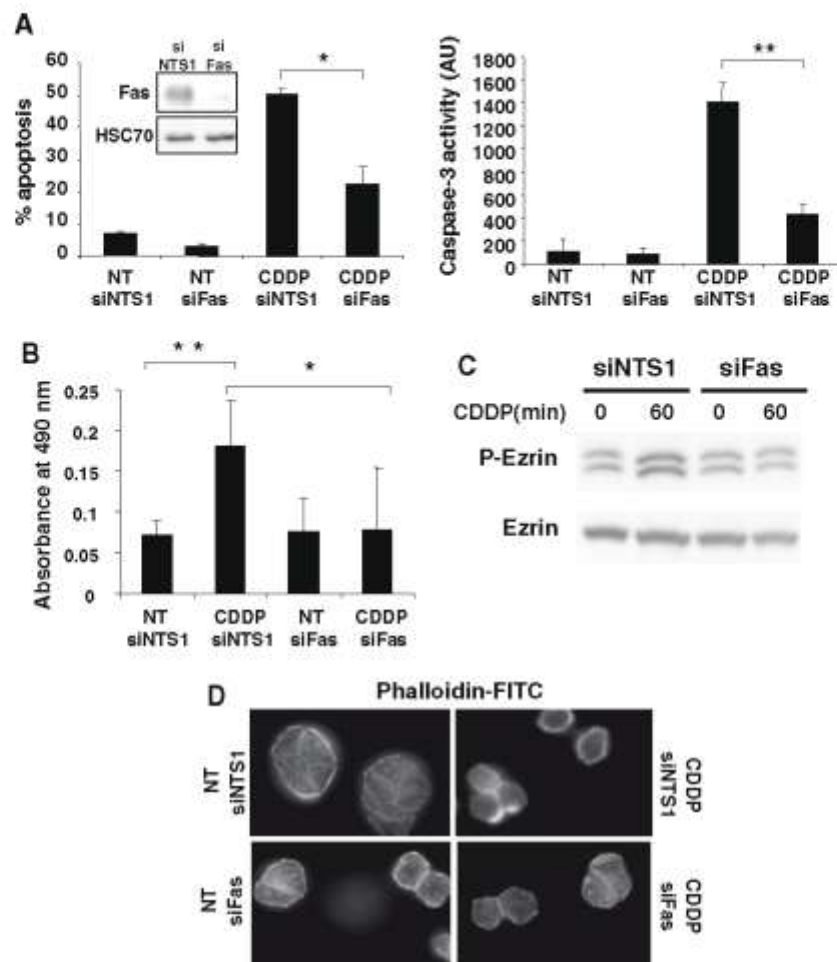


Fig. 5 – Fas is involved in cisplatin-induced actin reorganisation (A) Interfering with Fas mRNA expression reduces cisplatin-induced apoptosis. HT29 cells were transiently transfected with siRNA Fas (siFas) or siRNA NTS1 (siNTS1 used as a negative control). For Western-blot analysis (see inset), the cells were harvested 48 h after transfection. For cell death analysis, 48 h after cell transfection, HT29 cells were treated or not with 25 μ M cisplatin (CDDP) for 48 h. Percentages of apoptotic cells were estimated as in Fig. 1D. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of three independent experiments. * $p \leq 0.05$, siFas-CDDP versus siNTS1-CDDP (left panel). Caspase-3 activation was measured as in Fig. 2C. Data are expressed in arbitrary units (AU) as mean $\pm$ SEM of three independent experiments. ** $p \leq 0.01$, siFas-CDDP versus siNTS1-CDDP (right panel). **(B)** Interfering with Fas mRNA expression inhibits cisplatin-induced RhoA activation. HT29 cells were transiently transfected with siRNA Fas (siFas) or siRNA NTS1 (siNTS1 used as a negative control). Forty-eight hours after cell transfection, HT29 cells were treated or not (NT) with 25 μ M CDDP for 30 min and RhoA activation was measured with a G-LISA™ kit. Data shown are absorbance over background signal expressed as mean $\pm$ SEM of three independent experiments. * $p \leq 0.01$, siNTS1-CDDP versus siNTS1-NT; ** $p \leq 0.05$, siFas-CDDP versus siNTS1-CDDP. **(C)** Interfering with Fas mRNA expression inhibits cisplatin-induced ezrin phosphorylation. HT29 cells were transiently transfected with siRNA Fas (siFas) or siRNA NTS1 (siNTS1 used as a negative control). Forty-eight hours after cell transfection, HT29 cells were treated or not (NT) with 25 μ M CDDP for 1 h. Phospho-ezrin (P-Ezrin) expression was evidenced by Western-blot analysis as previously described in Fig. 4B. One representative of three independent experiments is shown. **(D)** Interfering with Fas mRNA expression inhibits cisplatin-induced actin reorganisation. HT29 cells were transiently transfected with siRNA Fas (siFas) or siRNA NTS1 (siNTS1 used as a negative control). For fluorescence microscopy analysis, 48 h after cell transfection, HT29 cells were treated or not (NT) with 25 μ M CDDP for 2 h. Actin microfilaments were evidenced by fluorescence microscopy using phalloidin-FITC. Bars, 10 μ M. One representative of three independent experiments is shown.

Malignant cells often have altered expression of Fas or low F/ G-actin ratio (increased non-polymerised G-actin with con-

comitantly decreased polymerised double-helical F-actin)³⁰ which could contribute to cisplatin resistance in cancer cells.

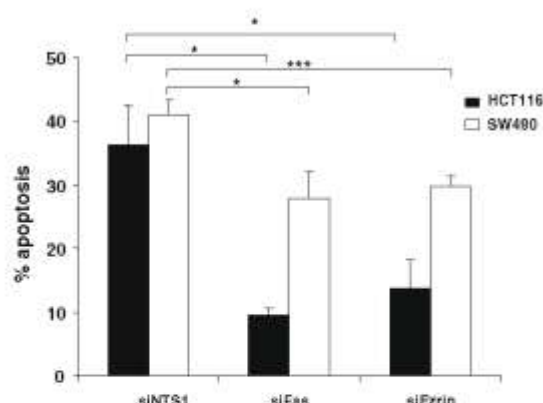


Fig. 6 – Transient transfection with siFas or siEzrin significantly inhibits cisplatin-induced apoptosis in HCT116 and SW480 human colon cancer cells. HCT116 and SW480 cells were transiently transfected with siNTS1, siFas or siEzrin for 48 h, then treated with 25 μ M CDDP for 48 h. Percentage of apoptosis was determined as in Fig. 1D. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of three independent experiments. * p $\leq$ 0.05, *** p $\leq$ 0.001, siFas-CDDP versus siNTS1-CDDP or siEzrin-CDDP versus siNTS1-CDDP.

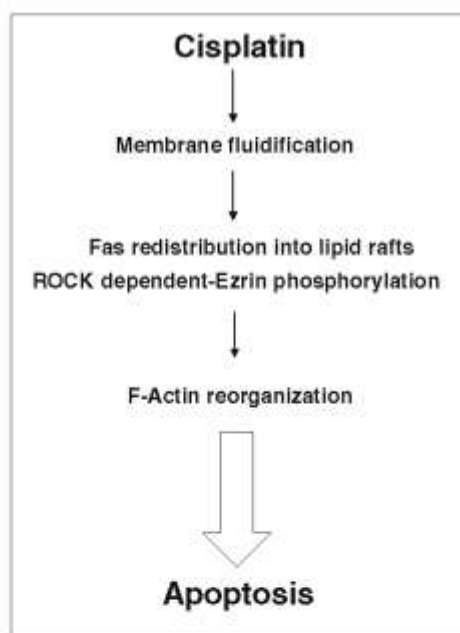


Fig. 7 – Hypothetical scheme showing the molecular ordering of the early Signalling events in cisplatin-induced apoptosis.

In fact, the Fas death pathway has been considered as a possible target for cancer treatment³¹ and a loss of drug-induced activation of the CD95-signalling pathway has been observed in a cisplatin-resistant testicular germ tumour cell line,³² suggesting that a functional CD95-signalling pathway may be an

important factor determining cisplatin sensitivity. Altogether, these findings may serve to define new therapeutical strategies based on cisplatin therapy taking into account the functionality of the Fas death receptor pathway that could be disrupted at several steps in human cancers.

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgements

The authors are grateful to Prof. Erich Gulbins and Dr. Corinne Martin-Chouly for helpful discussions and Martine Chevanne and Mary Rissel for technical assistance. We also thank Stephanie Dutertre and the platform of fluorescence microscopy (IFR 140 GFAS, Rennes). This work was supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (the Côte d'Armor, Ille et Vilaine and Loire-Atlantique Committees), Rennes Métropole and the Région Bretagne.

REFERENCES

- Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22:7265–79.
- Wang K, Lu J, Li R. The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coord Chem Rev* 1996;151:53–88.
- Micheau O, Solary E, Hammann A, Dimanche-Boitrel MT. Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. *J Biol Chem* 1999;274:7987–92.
- Kischkel PC, Hellbardt S, Behrmann I, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995;14:5579–88.
- Scheel Toellner D, Wang K, Singh R, et al. The death-inducing signaling complex is recruited to lipid rafts in Fas-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:876–9.
- Hueber AO, Bernard AM, Herincs Z, Couzinet A, He HT. An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep* 2002;3:190–6.
- Gajate C, Mollinedo F. The antitumor ether lipid ET-18-OCH₃ induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* 2001;98:3860–3.
- Lacour S, Hammann A, Grazide S, et al. Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:3593–8.
- Grassme H, Jekle A, Riehle A, et al. CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 2001;273:20589–96.
- Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 2002;22:207–20.
- Chakrabandhu K, Herincs Z, Huault S, et al. Palmitoylation is required for efficient Fas cell death signaling. *EMBO J* 2007;26:209–20.
- Parlato S, Giammarigli AM, Logozzi M, et al. CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. *EMBO J* 2000;19:5123–34.

13. Hébert M, Potin S, Sebbagh M. Rho-ROCK-dependent ezrin-radixin-moesin phosphorylation regulates Fas-mediated apoptosis in Jurkat cells. *J Immunol* 2008;**181**:5963–73.
14. Rebillard A, Tekpli X, Meurette O, et al. Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification via inhibition of NHE1 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2007;**67**:7865–74.
15. Fais S, De Milito A, Lozupone F. The role of FAS to ezrin association in FAS-mediated apoptosis. *Apoptosis* 2005;**10**:941–7.
16. Ridley AJ. Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic* 2001;**2**:303–10.
17. Shaw RJ, Henry M, Solomon F, Jacks J. RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts. *Mol Biol Cell* 1998;**9**:403–19.
18. Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;**4**:446–56.
19. Odaka C, Sanders ML, Crews P. Jasplakinolide induces apoptosis in various transformed cell lines by a caspase-3-like protease-dependent pathway. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;**7**:947–52.
20. Posey SC, Bierer BE. Actin stabilization by jasplakinolide enhances apoptosis induced by cytokine deprivation. *J Biol Chem* 1999;**274**:4259–65.
21. Janmey PA. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev* 1998;**78**:763–81.
22. Zeidan YH, Jenkins RW, Hannun YA. Remodeling of cellular cytoskeleton by the acid sphingomyelinase/ceramide pathway. *J Cell Biol* 2008;**181**:335–50.
23. Ivetic A, Ridley AJ. Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signaling in leucocytes. *Immunology* 2004;**112**:165–76.
24. Lozupone F, Lugini L, Matarrese P, et al. Identification and relevance of the CD95-binding domain in the N-terminal region of ezrin. *J Biol Chem* 2004;**279**:9199–207.
25. Yonemura S, Matsui T, Tsukita S. Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo. *J Cell Sci* 2002;**115**:2569–80.
26. Subauste MC, Von Herrath M, Benard V, et al. Rho family proteins modulate rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes and Fas. *J Biol Chem* 2000;**275**:9725–33.
27. Zeng HH, Lu JF, Wang K. The effect of cisplatin and transplatin on the conformation and association of F-actin. *Cell Biol Int* 1995;**19**:491–7.
28. Ndozangue-Tourigoue O, Hamelin J, Breard J. Cytoskeleton and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2008;**76**:11–8.
29. Yang Z, Schumaker LM, Egorin MJ, et al. Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. *Clin Cancer Res* 2006;**12**:5817–25.
30. Rao J, Li N. Microfilament actin remodeling as a potential target for cancer drug development. *Curr Cancer Drug Tar* 2004;**4**:345–54.
31. Timmer T, de Vries EG, de Jong S. Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? *J Pathol* 2002;**196**:125–34.
32. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, de Jong S. Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatin-resistant testicular germ cell tumor cell line. *Cell Death Differ* 2003;**10**:808–22.

Résumé

Le CD95 appartient à la famille du TNF-R. Il est capable de déclencher un signal apoptotique et joue un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire et dans l'élimination de cellules infectées ou transformées. Suite à la fixation de son ligand le CD95L ou d'un anticorps agoniste, le CD95 recrute la protéine FADD, qui à son tour agrège les caspases initiateuses (*i.e.*, caspase -8 et -10). Le complexe formé par le CD95, FADD et les caspases -8/10 est appelé DISC, pour *Death Inducing Signaling Complex*. Une fois le DISC formé, l'agrégation des caspases initiateuses entraîne leur activation, et la mort de la cellule par apoptose. Ce signal médié par CD95, peut être modulé par la distribution ou l'exclusion du récepteur vis à vis des microdomaines membranaires ou radeaux lipidiques. Ces domaines de la membrane plasmique sont des structures membranaires enrichies en sphingolipides et cholestérol. La relocalisation de CD95 dans ces radeaux lipidiques permet d'amplifier le signal de mort. L'activation de la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt, est connue pour sa capacité à protéger les cellules tumorales du signal apoptotique médié par CD95, et à induire des mouvements latéraux de CD95 à la membrane. Nos travaux montrent que l'inhibition de la voie PI3K/Akt induit i) la relocalisation du CD95 dans les microdomaines et ii) l'induction du signal apoptotique CD95 indépendamment de la présence du ligand CD95L. Ainsi, nous mettons en évidence que la voie PI3K/Akt est capable d'augmenter le seuil d'activation du signal CD95 en agissant en amont de la formation du DISC ou de l'interaction CD95/CD95L, en maintenant le récepteur exclu des microdomaines.

Mots clés : Apoptose - CD95 - PI3K – Akt - Microdomaines

Abstract

CD95 belongs to the TNF-R superfamily, and it triggers an apoptotic signal. CD95 plays a key role in homeostasis of the immune system and in the elimination of infected and transformed cells. Upon CD95L binding, CD95 recruits FADD, which in turn aggregates initiator caspases (*i.e.*, caspase-8 and -10). The complex CD95, FADD and caspase-8/10 is called DISC for *Death Inducing Signaling Complex*. At the DISC level, caspase aggregation leads to their activation and death of the cells through apoptosis. The CD95-mediated apoptotic signal is modulated by microdomains, or lipid rafts, which are plasma membrane sub-domains enriched in sphingolipids and cholesterol. Thereby, partition of CD95 into lipid rafts promotes the apoptotic signal. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway is known to prevent the CD95-mediated apoptotic signal in malignant cells, and to control lateral mobility of CD95 at the plasma membrane. Herein, we showed that inhibition of PI3K signal induced i) the distribution of CD95 into lipid rafts and ii) the subsequent induction of the CD95-mediated apoptotic signal through a CD95L independent manner. In conclusion, we pinpointed that PI3K/Akt signaling pathway inhibits the CD95 signal by acting upstream DISC formation and even upstream the CD95-CD95L interaction through the exclusion of the death receptor from the microdomains.

Key words : Apoptosis - CD95 - PI3K – Akt - Microdomains