

## **D**eux mécanismes moléculaires pour la cytotoxicité T : perforine/granzymes et Fas

Après trente ans de phénoménologie, les recherches sur la cytotoxicité par lymphocytes T connaissent une brusque accélération moléculaire. Deux mécanismes ont été récemment démontrés, l'un fondé sur une exocytose granulaire et impliquant perforine et granzymes, l'autre sur une interaction membranaire directe et impliquant la molécule Fas et son ligand. Le présent article rapporte ces résultats et certaines de leurs implications.

### **De la démonstration d'un mécanisme exocytose granulaire/perforine/granzymes...**

Suivant un mécanisme suggéré il y a dix ans [1, 2], quand un lymphocyte T cytotoxique (Tc) rencontre une cellule cible, des granules contenus dans la cellule Tc libèrent à l'interface entre Tc et la cible une molécule formant canal, appelée perforine, et des sérine estérases appelées granzymes. La démonstration formelle d'un rôle pour la perforine a été obtenue par des expériences utilisant des souris à gène perforine inactivé [3]. Chez ces souris, une grande partie de la cytotoxicité antivirale et anti-allogénique a disparu avec, de plus, perte de la protection contre certaines infections virales. La perforine est donc impliquée dans un mécanisme essentiel de la cytotoxicité, qui protège vraisemblablement contre les infections virales.

On ne sait toujours pas précisément comment la perforine contribue à la mort de cellules cibles dans ce mécanisme de cytotoxicité par Tc. La perforine seule ne suffit pas, puisque

l'addition à des cibles de concentrations élevées de perforine purifiée entraîne leur mort par nécrose [4, 5] alors que les Tc causent une mort par apoptose [6-8]. En association avec la perforine, d'autres molécules semblent nécessaires, notamment certaines sérine estérases contenues dans des granules de Tc et appelées granzymes [9, 10]. L'étude de souris à gène *granzyme B* inactivé a permis de montrer que le granzyme B est nécessaire à la cytotoxicité à médiation cellulaire T [11]. Il est très vraisemblable que le granzyme B n'est pas le seul granzyme impliqué. La création d'une lignée de souris à gène *granzyme A* inactivé devrait permettre de répondre prochainement à cette question, au besoin après croisement avec des souris à gène *granzyme B* inactivé.

### **... à la recherche d'autres mécanismes**

Plusieurs arguments suggéraient qu'au moins un autre mécanisme que celui impliquant la perforine était en jeu dans la cytotoxicité par Tc. En effet, certaines Tc ne contiennent pas de perforine détectable [12]. De plus, quoique l'effet cytotoxique de la plupart des populations de Tc ou des clones Tc nécessite du calcium extracellulaire, ce qui est compatible avec les besoins en calcium du mécanisme impliquant la perforine [13-15], une partie de l'activité cytotoxique est souvent indépendante du calcium extracellulaire [16-20]. Enfin, des Tc provenant de souris au gène perforine inactivé expriment encore une fraction de la cy-

tototoxicité des cellules de souris sauvages, ce qui fait s'interroger sur le mécanisme moléculaire de cette cytotoxicité résiduelle.

On sait depuis quelques années que certains ligands peuvent se lier à des récepteurs à la surface d'une cellule, et induire la transduction d'un signal. Ce signal peut être interprété dans la cellule comme un signal de mort. Par exemple, des antigènes peuvent se lier à des immunoglobulines de surface de cellules B ou à des récepteurs de cellules T, et conduire dans certains cas à la mort de ces cellules. De même, l'engagement par le TNF, ou par des anticorps spécifiques, de récepteurs pour le TNF à la surface de certaines cellules peut conduire à leur mort. De façon similaire, la molécule de surface cellulaire appelée Fas ou APO-1 [21-24] peut transduire un signal de mort cellulaire quand elle est complexée par des anticorps [21, 22] ou par son ligand (*voir plus loin*).

Nous avons fait l'hypothèse qu'un mécanisme de mort par Tc pourrait opérer par l'intermédiaire d'une molécule localisée à la surface de la cellule cible et transduisant un signal. Un clone cytotoxique modèle, appelé d10S, ne tuant vraisemblablement que par ce type de mécanisme, a été isolé par sous-clonage en série à partir d'un hybridome T [25]. Des cellules d10S activées se sont montrées capables, à notre surprise initiale, de lyser de façon très significative des thymocytes à des rapports aussi bas que 0,1:1 [26]. Nous avons fait le rapport entre ces résultats et un travail [27] signalant, premièrement, que Fas est abondamment exprimé

dans le thymus de souris normales, et, deuxièmement, qu'une expression anormalement faible de Fas est la lésion moléculaire primaire de la souris mutante *lpr* [28]. Cela a complété l'hypothèse de travail et fourni une façon de la tester.

Nous avons ainsi pu montrer que des cellules d10S activées sont capables de lyser des thymocytes sauvages mais pas des thymocytes *lpr* [26], première observation suggérant un rôle pour Fas dans un mécanisme de cytotoxicité. Aussi, des cellules d10S activées, cytotoxiques pour un grand nombre de cellules tumorales cibles conventionnelles comme YAC, EL-4 et P815, qui expriment Fas, ne lysent pas des cellules L1210, qui ne l'expriment que très peu. Ces cellules L1210 ont été transfectées avec de l'ADNc de Fas, conduisant à l'obtention de cellules L1210-Fas, exprimant Fas et sensibles à d10S. Ainsi, par deux approches indépendantes (mutants et transfectants), l'expression de Fas sur la cellule cible s'avère nécessaire à la lyse par des cellules d10S. Ce mécanisme n'est pas particulier à d10S, mais est, en fait, utilisé par pratiquement toutes les cellules T, qu'il s'agisse de clones ou de populations. En particulier, des cellules cytotoxiques spécifiques de l'antigène, obtenues par culture mixte lymphocytaire ou dans des exsudats péritonéaux allo-immuns, peuvent exercer une cytotoxicité impliquant Fas [26]. Ces résultats sont maintenant largement confirmés [29-31].

Ces données permettaient d'établir un schéma provisoire du mécanisme impliquant Fas (figure 1). Dans ce schéma, Fas est nécessaire à la surface de la cellule cible, ce qui implique la disponibilité fonctionnelle d'un ligand de Fas à la surface de la cellule effectrice.

### Un ligand de Fas à la surface de la cellule effectrice...

Nagata et ses collègues à Osaka ont sélectionné à partir de cellules d10S des variants liant de fortes quantités de molécules chimériques Fas-Fc, donc exprimant vraisemblablement des quantités élevées de ligand de Fas. A partir de ces variants, l'ADNc du ligand de Fas a été cloné par ex-

pression [32]. La séquence de ce ligand de Fas est homologue des séquences des TNF et des ligands de CD40, CD27 et CD30 (*m/s n° 2, vol. 10, p. 234, [32]*). Ainsi, une famille de ligands homologues, incluant le ligand de Fas, les TNF et les ligands de CD40, CD27 et CD30, correspond molécule à molécule à une famille de récepteurs homologues, incluant Fas, les récepteurs pour le TNF, CD40, CD27 et CD30.

L'ADNc du ligand de Fas a été transfecté dans des cellules Cos. Alors que les cellules Cos ne sont pas cytotoxiques, les transfectants obtenus sont fortement cytotoxiques, et uniquement pour des cellules cibles exprimant Fas [32]. Ainsi, et de façon spectaculaire, la transfection du ligand de Fas suffit à conférer une activité cytotoxique à des cellules Cos. Comme ces dernières sont de type fibroblastique, ces résultats montrent que ce mécanisme de cytotoxicité peut se produire en l'absence d'autres molécules préférentiellement exprimées sur des lymphocytes activés. De plus, la protéine ligand de Fas purifiée possède une activité cytotoxique forte contre des cellules cibles portant Fas [33], montrant que des molécules de cellules tueuses autres que le ligand de Fas ne sont pas nécessaires à l'exécution du mécanisme impliquant Fas.

En conjonction avec d'autres résultats, indiquant que certains granzymes ne sont pas exprimés dans les cellules d10S [25], les expériences ci-dessus montrent qu'au moins certains composants du mécanisme impliquant Fas. De la même façon, des cellules effectrices provenant de souris à gène *perforine* inactivé peuvent lyser par le mécanisme impliquant Fas [3, 34] et des cellules effectrices de souris *gld*, incapables de lyser par le mécanisme impliquant Fas [35, 36] du fait d'une mutation du ligand de Fas (*m/s n° 6-7, vol. 10, p. 735, [37]*), sont capables de lyser par le mécanisme impliquant la perforine [35]. Aucun composant moléculaire commun n'a donc été détecté pour l'instant entre ces deux mécanismes au niveau de leur exécution. Cela est d'autant plus remarquable que ces mécanismes

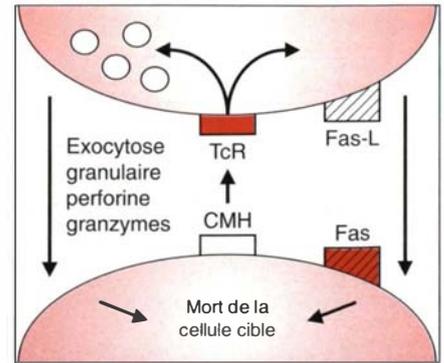


Figure 1. **Deux mécanismes majeurs de cytotoxicité par cellules T.** L'engagement du TCR par des antigènes du CMH à la surface de la cellule cible induit, à la fois, l'exocytose granulaire et l'expression du ligand de Fas. Le mécanisme dépendant de Fas implique, à la surface de la cellule cible, au moins Fas pour la transduction d'un signal de mort cellulaire et des molécules du CMH pour assurer la reconnaissance spécifique. Symétriquement, à la surface de la cellule tueuse, sont impliqués au moins le TCR et le ligand de Fas. En termes moléculaires, Fas définit ce mécanisme de cytotoxicité au niveau de la cellule cible, alors que le ligand de Fas le définit au niveau de la cellule effectrice.

peuvent coexister dans les mêmes cellules effectrices [38].

Ainsi, la cytotoxicité par Tc impliquant Fas est maintenant définie en termes moléculaires, non seulement par la nécessité de Fas à la surface de la cellule cible, mais également par la nécessité d'un ligand de Fas à la surface de la cellule effectrice. TCR et CMH, et Fas et son ligand sur leurs cellules respectives interagissent quand une cellule effectrice rencontre une cellule cible. Nous ne savons pas si, lors de cette rencontre, il y a interaction, par exemple à finalité modulatrice, de molécules autres que celles-ci.

### ... exprimé après engagement du TCR

Des cellules de culture mixte lymphocytaire au jour 5 n'expriment pas

de quantité détectable de ligand de Fas, mais sont capables d'exercer une cytotoxicité spécifique de l'antigène et impliquant Fas (donc le ligand de Fas à leur surface), dans un test de cytotoxicité de 4 h. L'explication de ce paradoxe réside dans la rapidité de l'induction de l'expression du ligand de Fas lors de la reconnaissance spécifique par le TCR. Dans des systèmes modèles où le TCR est stimulé par des anticorps anti-TCR ou anti-CD3 [38, 39], l'expression de ce ligand peut se produire en 1 h. Dans un test de cytotoxicité de 4 h, se déroulent en fait deux étapes distinctes: (1) l'induction, au cours de laquelle la reconnaissance d'une molécule du CMH sur les cellules cibles entraîne l'engagement du TCR, la transduction d'un signal dans la cellule tueuse, et l'expression du ligand de Fas; et (2) l'exécution du mécanisme de cytotoxicité, où le ligand de Fas sur la cellule tueuse engage Fas sur la cible, avec transduction d'un signal dans la cible et mort de celle-ci. En d'autres termes, il y a induction, spécifique de l'antigène, d'une exécution non spécifique de l'antigène et dépendante de Fas. La spécificité antigénique dans un test de cytotoxicité réside au stade d'induction, et non au stade d'exécution de cette cytotoxicité.

Par ailleurs, cette connexion entre TCR et ligand de Fas, qui peut s'établir à partir d'un signal issu de la seule chaîne  $\zeta$  de CD3, semble impliquer des tyrosine protéine kinases et la calcineurine, et dépend du calcium extracellulaire [38, 39]. Sur un plan méthodologique, pour la cytotoxicité impliquant Fas, l'induction est donc dépendante du calcium extracellulaire alors que l'exécution en est indépendante, ce qui impose une certaine prudence si on veut identifier un mécanisme de cytotoxicité par ses besoins en calcium. De façon plus générale, l'expression du ligand de Fas semble induite par une voie très comparable à celle qui préside à l'induction de certaines interleukines, comme l'IL2, l'interféron  $\gamma$ , le TNF  $\alpha$ ; la rapidité de cette induction est peut-être ce qui l'individualise.

*In vivo*, le mécanisme de cytotoxicité impliquant Fas doit être limité, à la fois par l'expression d'un ligand de

Fas fonctionnel sur des cellules effectrices, et l'expression de Fas sur des cellules cibles potentielles. Chez la souris, Fas est exprimé [24] dans le thymus, le foie, l'ovaire et le cœur et n'a pas été détecté dans le cerveau, la rate, la moelle osseuse, le rein, les testicules, et l'utérus. Chez l'homme, Fas (identique à APO-1 [40]) est exprimé sur des types cellulaires variés [21-23, 41-43], comme des cellules myéloïdes et des fibroblastes, sur certaines mais pas sur toutes les lignées cellulaires lymphoïdes B et T, sur des lymphocytes activés plus que sur des lymphocytes au repos, et sur certains lymphocytes infectés par des virus. Le ligand de Fas est exprimé principalement sur des cellules T activées, et dans les testicules [32]. Ainsi, une expression marquée, à la fois de Fas et de son ligand, a été trouvée jusqu'à présent seulement parmi des populations lymphocytaires activées, soulignant le rôle immunorégulateur possible de la cytotoxicité impliquant Fas (*voir plus bas*).

#### **Les mécanismes impliquant la perforine ou Fas semblent rendre très largement compte de la cytotoxicité par Tc *in vitro***

Le mécanisme de cytotoxicité T impliquant Fas a pu être détecté sans peine dans des cellules de souris à gène *perforine* inactivé, et semble rendre compte de l'ensemble de la cytotoxicité par ces cellules. Cela a été démontré dans de nombreux systèmes, en particulier pour des cellules de culture mixte lymphocytaire et d'exsudats péritonéaux allo-immuns spécifiquement sensibilisées contre des cellules allogéniques, et pour des cellules spléniques sensibilisées contre certains virus. En d'autres termes, dans les systèmes expérimentaux utilisés, aucun mécanisme de cytotoxicité à médiation cellulaire T autre que les mécanismes impliquant la perforine ou Fas n'a pu être détecté [34]. Des résultats analogues ont été obtenus dans d'autres laboratoires [44, 45].

Cette conclusion que la cytotoxicité à médiation cellulaire T *in vitro* implique ces deux mécanismes, et ces deux mécanismes seulement, est soumise aux réserves suivantes. Premiè-

rement, le mécanisme détaillé de la cytotoxicité relayé par la perforine n'est pas connu et peut, lui-même, être hétérogène, impliquant par exemple, soit la perforine seule, soit perforine et granzymes. Deuxièmement, ces travaux considèrent seulement la cytotoxicité détectée dans des expériences à court terme, *in vitro*. Il n'est nullement exclu que d'autres mécanismes puissent être impliqués dans des tests de cytotoxicité *in vitro* plus longs ou utilisant un spectre plus large de cellules cibles. Troisièmement, des situations *in vivo* peuvent impliquer également d'autres mécanismes. Pour explorer cette possibilité, nous préparons des souris doubles homozygotes  $P^o \times gld$ , qui devraient n'exprimer, ni le ligand de la perforine, ni Fas.

D'un autre point de vue, la cytotoxicité passant par Fas ne nécessite pas de calcium extracellulaire, et contrairement à la cytotoxicité impliquant la perforine, peut encore être détectée en présence de EGTA-Mg<sup>2+</sup> [25, 26]. Suivant ce critère, cette cytotoxicité ne rendrait compte que de 10% à 20% [16, 26] de la cytotoxicité à médiation cellulaire T spécifique de l'antigène. Des résultats plus récents suggèrent que cette valeur peut être sous-estimée. Des évaluations directes chez des souris à gène *perforine* inactivé [34] et l'observation que l'induction, contrairement à l'exécution de la cytotoxicité basée sur Fas, dépend du calcium (*voir plus haut*, [39]), suggèrent que les mécanismes impliquant la perforine ou Fas peuvent être du même ordre de grandeur sur des cellules cibles appropriées [34]. L'existence de deux mécanismes moléculaires de cytotoxicité distincts pose l'intéressant problème de l'origine de chacun de ces mécanismes au cours de l'évolution. Le mécanisme impliquant la perforine et l'exocytose granulaire pourrait avoir une origine commune avec la dégranulation mastocytaire, comme s'il avait été emprunté par le système immunitaire à l'une des voies de celle-ci. Le mécanisme impliquant Fas semble davantage apparenté à une mort cellulaire liée au développement, comme s'il avait été emprunté par le système immunitaire à une des voies de celle-ci. Comment deux mécanismes si dif-

férents, et d'origine vraisemblablement différente, ont-ils pu converger dans les mêmes cellules pour exercer la cytotoxicité ? Une approche ontologique ou phylogénétique pourrait permettre d'aborder cette question.

### Pourquoi deux mécanismes plutôt qu'un seul ? De la cytotoxicité à la régulation

La multiplicité des mécanismes peut optimiser l'efficacité cytotoxique, au moins contre certaines cellules cibles. Il se pourrait également que ces mécanismes aient des rôles distincts. En particulier, la cytotoxicité impliquant Fas peut avoir un rôle immunorégulateur. En effet, Fas est nécessaire, non seulement à un mécanisme de cytotoxicité, mais aussi au contrôle du développement lymphocytaire, comme indiqué par la lympho-accumulation et la maladie auto-immune observées chez les souris *lpr* [28, 46] anormales pour l'expression de Fas (*m/s* n° 7, vol. 8, p. 735 ; n° 7, vol. 10, p. 735, [27]). Ces deux rôles de Fas – cytotoxicité et contrôle lymphocytaire – peuvent être liés de façon causale : la cytotoxicité relayée par Fas peut aussi assurer le contrôle passant par Fas. En d'autres termes, certaines cellules cytotoxiques pourraient détruire des lymphocytes activés syngéniques par le mécanisme impliquant Fas, contribuant ainsi à la délétion périphérique de cellules engagées dans une réponse immune, et donc à la régulation négative de cette réponse.

Expérimentalement, des lymphocytes activés *in vitro* et restimulés peuvent effectivement assurer par un mécanisme dépendant de Fas la lyse de lymphocytes activés syngéniques [35]. Ces résultats, tout en ne prouvant pas la relation causale entre contrôle de la lymphoprolifération et cytotoxicité dépendant de Fas, démontrent l'existence de la machinerie nécessaire à cette relation causale. La cytotoxicité dépendante de Fas peut ainsi participer en partie à l'élimination clonale de cellules T périphériques [47] et peut-être également à l'élimination de cellules B [48]. Cela serait cohérent avec la diminution de l'efficacité de la délétion périphérique observée dans des

modèles *in vitro* utilisant des cellules de souris *lpr* ou *gld* [49, 50].

Le mécanisme de la cytotoxicité dépendante de Fas peut ainsi rendre compte, au moins en partie, du contrôle par Fas de la lymphoprolifération. Il peut représenter un mécanisme, très probablement parmi d'autres, permettant le contrôle de la réponse immune. Les cellules T cytotoxiques peuvent ainsi exercer deux rôles, le rôle classique de défense contre «non-soi» ou «soi modifié», et un rôle régulateur impliquant Fas, agissant sur «soi activé» et contribuant à la régulation négative des réponses immunes. Comme Fas est aussi capable de stimuler plutôt que de tuer certaines cellules [51-53], on ne peut exclure la possibilité d'une régulation impliquant Fas, autre que négative. Dans ce sens, au moins certaines cellules T cytotoxiques doivent être également considérées comme des cellules régulatrices. Il est intéressant de se demander si une partie de la phénoménologie liée à des cellules

« suppressives » ne pourrait pas être liée à ces cellules tueuses régulatrices.

Dans cette régulation impliquant Fas (figure 2), des lymphocytes activés sont restimulés par engagement du TCR lors d'une reconnaissance antigénique. Cela conduirait à une expression du ligand de Fas sur certaines cellules et de Fas sur les mêmes cellules ou sur d'autres lymphocytes activés. Des interactions entre ligand de Fas et Fas conduiraient à la mort cellulaire. Ces phénomènes fourniraient ainsi un exemple de contrôle social de mort ou de vie cellulaire [54], comme dans d'autres systèmes [55-57], impliquant dans ce cas des cellules très semblables, se tuant les unes les autres par interaction membranaire directe. Cela, de nouveau, évoque pour le système Fas des antécédents liés au développement.

On peut se demander si des mécanismes similaires impliquant Fas peuvent être en jeu dans certains proces-

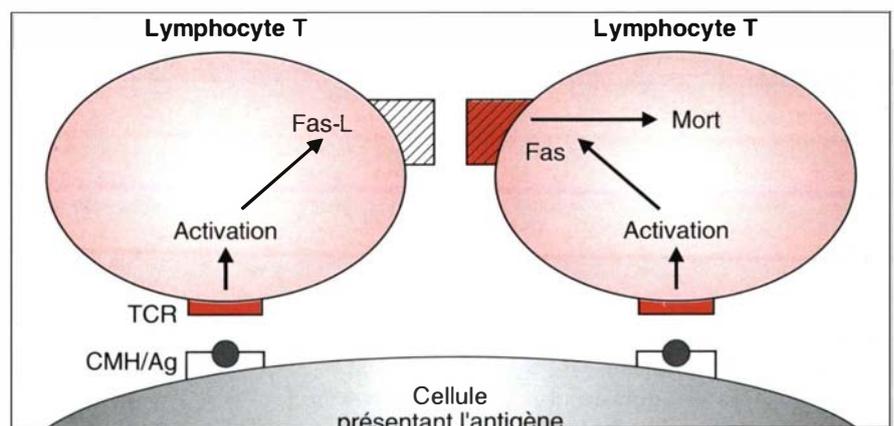


Figure 2. **Un mécanisme possible liant cytotoxicité et régulation dépendant de Fas.** Au pic d'une réponse immune, la stimulation ou la restimulation antigénique induit sur des lymphocytes T l'expression de Fas et du ligand de Fas (ici sur des cellules différentes, quoique la co-expression ne soit pas exclue). Une cytotoxicité impliquant Fas peut alors éliminer des lymphocytes spécifiques de l'antigène en cause contribuant, par délétion périphérique, à la régulation négative de cette réponse immune.

sus pathologiques acquis ou congénitaux dans le système immunitaire. S'ils sont déficients, ces mécanismes peuvent conduire, par exemple, à une mauvaise limitation des réactions immunes, aboutissant à des réactions auto-immunes comme dans les souris *lpr* ou *gld*. S'ils sont exagérés, ces mécanismes peuvent conduire en particulier à une déplétion lymphocytaire et à des immunodéficiences, et pourraient jouer un rôle dans des situations pathologiques aiguës ou chroniques d'activation de cellules T ■

#### Remerciements

Je remercie Valérie Depraetere et Françoise Vignaux pour leurs commentaires sur ce texte. Les recherches du laboratoire citées ici ont bénéficié du soutien de l'Inserm, du Cnrs et de l'Arc.

#### Pierre Golstein

Directeur de recherche à l'Inserm, Inserm U. 136, centre d'immunologie Inserm-Cnrs de Marseille-Luminy, Case 906, 13288 Marseille Cedex 9, France.

#### RÉFÉRENCES

- Henkart PA. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 1985 ; 3 : 31-58.
- Podack ER. Molecular mechanism of lymphocyte-mediated tumor cell lysis. *Immunol Today* 1985 ; 6 : 21-7.
- Kagi D, Ledermann B, Burki K, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994 ; 369 : 31-7.
- Gromkowski SH, Brown TC, Masson D, Tschopp J. Lack of DNA degradation in target cells lysed by granules derived from cytolytic T lymphocytes. *J Immunol* 1988 ; 141 : 774-8.
- Duke RC, Persechini PM, Chang S, Liu CC, Cohen JJ, Young JDE. Purified perforin induces target cell lysis but not DNA fragmentation. *J Exp Med* 1989 ; 170 : 1451-6.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 ; 26 : 239-57.
- Cohen JJ. Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol* 1991 ; 50 : 55-83.
- Golstein P, Ojcius DM, Young JDE. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 1991 ; 121 : 29-65.
- Shiver JW, Su L, Henkart PA. Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukemia cells expressing both cytolytic and granzyme A. *Cell* 1992 ; 71 : 315-22.
- Shi L, Kraut RP, Aebersold R, Greenberg AH. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *J Exp Med* 1992 ; 175 : 553-66.
- Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 1994 ; 76 : 977-87.
- Berke G. The cytolytic T lymphocyte and its mode of action. *Immunol Lett* 1989 ; 20 : 169-78.
- Podack ER, Young JDE, Cohn ZA. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 ; 82 : 8629-33.
- Young JDE, Damiano A, Dinome MA, Leong LG, Cohn ZA. Dissociation of membrane binding and lytic activities of the lymphocyte pore-forming protein (perforin). *J Exp Med* 1987 ; 165 : 1371-82.
- Ishiura S, Matsuda K, Koizumi H, Tsukahara T, Arahata K, Sugita H. Calcium is essential for both the membrane binding and lytic activity of pore-forming protein (perforin) from cytotoxic T-lymphocyte. *Mol Immunol* 1990 ; 27 : 803-7.
- Mac Lennan ICM, Gotch FM, Golstein P. Limited specific T-cell mediated cytotoxicity in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>. *Immunology* 1980 ; 39 : 109-17.
- Tirosh R, Berke G. T lymphocyte-mediated cytotoxicity as an excitatory process of the target. I. Evidence that the target may be the site of Ca<sup>2+</sup> action. *Cell Immunol* 1985 ; 95 : 113-23.
- Trenn G, Takayama H, Sitkovsky MV. Exocytosis of cytolytic granules may not be required for target cell lysis by cytotoxic T-lymphocytes. *Nature* 1987 ; 330 : 72-4.
- Ostergaard HL, Kane KP, Mescher MF, Clark WR. Cytotoxic T lymphocyte mediated lysis without release of serine esterase. *Nature* 1987 ; 330 : 71-2.
- Young JDE, Clark WR, Liu CC, Cohn ZA. A calcium- and perforin-independent pathway of killing mediated by murine cytolytic lymphocytes. *J Exp Med* 1987 ; 166 : 1894-9.
- Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (Anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1989 ; 169 : 1747-56.
- Trauth BC, Klas C, Peters AMJ, et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989 ; 245 : 301-5.
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991 ; 66 : 233-43.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, et al. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 1992 ; 148 : 1274-9.
- Golstein P, Mattéi MG, Foa C, Luciani MF. Molecular mechanisms of T lymphocyte cytotoxicity, with emphasis on the Fas pathway. In: Gregory CD, ed. *Apoptosis and the immune response*. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1994 ; 143-68.
- Rouvier E, Luciani M-F, Golstein P. Fas involvement in Ca<sup>2+</sup>-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 1993 ; 177 : 195-200.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992 ; 356 : 314-7.
- Davidson WF, Dumont FJ, Bedigian HG, Fowlkes BJ, Morse HCIII. Phenotypic, functional, and molecular genetic comparisons of the abnormal lymphoid cells of C3H-*lpr/lpr* and C3H-*gld/gld* mice. *J Immunol* 1986 ; 136 : 4075-84.
- Stalder T, Hahn S, Erb P. Fas antigen is the major target molecule for CD4<sup>+</sup> T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1994 ; 152 : 1127-33.
- Hanabuchi S, Koyanagi M, Kawasaki A, et al. Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 4930-4.
- Ju ST, Cui H, Panka DJ, Ettinger R, Marshak-Rothstein A. Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4<sup>+</sup> Th1 and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 4185-9.
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Naga-

- taS. Molecular cloning and expression of the Fas ligand: a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993 ; 75 : 1169-78.
33. Suda T, Nagata S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med* 1994 ; 179 : 873-9.
34. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, *et al.* Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994 ; 265 : 528-30.
35. Vignaux F, Golstein P. Fas-based lymphocyte-mediated cytotoxicity against syngeneic activated lymphocytes: a regulatory pathway? *Eur J Immunol* 1994 ; 24 : 923-7.
36. Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, Tough TW, Alderson MR, Lynch DH. *gld/gld* mice are unable to express a functional ligand for Fas. *Eur J Immunol* 1994 ; 24 : 928-33.
37. Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, *et al.* Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994 ; 76 : 969-76.
38. Anel A, Buferne M, Boyer C, Schmitt-Verhulst AM, Golstein P. TCR-induced Fas ligand expression in CTL clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A. *Eur J Immunol* 1994 ; 24 : 2469-76.
39. Vignaux F, Vivier E, Malissen B, Depraetere V, Nagata S, Golstein P. TCR/CD3 coupling to Fas-based cytotoxicity. *J Exp Med* 1995 (sous presse).
40. Oehm A, Behrmann I, Falk W, *et al.* Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 10709-15.
41. Debatin KM, Goldmann CK, Bamford R, Waldmann TA, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated apoptosis in adult T-cell leukaemia. *Lancet* 1990 ; 335 : 497-500.
42. Kobayashi N, Hamamoto Y, Yamamoto N, Ishii A, Yonehara M, Yonehara S. Anti-Fas monoclonal antibody is cytotoxic to human immunodeficiency virus-infected cells without augmenting viral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 9620-4.
43. Owen-Schaub LB, Yonehara S, Crump WL III, Grimm EA. DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. *Cell Immunol* 1992 ; 140 : 197-205.
44. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 1994 ; 370 : 650-2.
45. Kojima H, Shinohara N, Hanaoka S, *et al.* Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1994 ; 1 : 357-64.
46. Cohen PL, Eisenberg RA. *lpr* and *gld*: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 1991 ; 9 : 243-69.
47. D'Adamio L, Awad KM, Reinhen EL. Thymic and peripheral apoptosis of antigen-specific T cells might cooperate in establishing self tolerance. *Eur J Immunol* 1993 ; 23 : 747-53.
48. Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA, *et al.* Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 1993 ; 72 : 325-35.
49. Russell JH, Rush B, Weaver C, Wang R. Mature T cells of autoimmune *lpr/lpr* mice have a defect in antigen-stimulated suicide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 4409-13.
50. Russell JH, Wang R. Autoimmune *gld* mutation uncouples suicide and cytokine/proliferation pathways in activated, mature T cells. *Eur J Immunol* 1993 ; 23 : 2379-82.
51. Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, *et al.* Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol* 1992 ; 149 : 3753-8.
52. Mapara MY, Bargou R, Zugck C, *et al.* APO-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with bcl-2 oncogene expression. *Eur J Immunol* 1993 ; 23 : 702-8.
53. Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, *et al.* Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med* 1993 ; 178 : 2231-5.
54. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992 ; 356 : 397-400.
55. Sulston JE, Albertson DG, Thomson JN. The *Caenorhabditis elegans* male: postembryonic development of nongonadal structures. *Dev Biol* 1980 ; 78 : 542-76.
56. Lang RA, Bishop JM. Macrophages are required for cell death and tissue remodeling in the developing mouse eye. *Cell* 1993 ; 74 : 453-62.
57. Graham A, Heyman I, Lumsden A. Even-numbered rhombomeres control the apoptotic elimination of neural crest cells from odd-numbered rhombomeres in the chick hindbrain. *Development* 1993 ; 119 : 233-45.

## TIRÉS À PART

P. Golstein.