

## Lymphocytes T cytotoxiques : le récepteur du mannose 6 phosphate permet l'endocytose du granzyme B dans la cellule cible

Les concepts dominants ont parfois la vie dure et, le plus souvent, ne tombent définitivement qu'une fois les bases moléculaires du phénomène biologique établies. C'est le cas du modèle de l'exocytose granulaire des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Depuis près de dix ans, il était admis que le granzyme B, enzyme protéolytique contenue dans les granules cytotoxiques des CTL, ne pénétrait dans les cellules cibles qu'à travers les canaux transmembranaires formés par les molécules de perforine (*m/s* 1995, n° 1, p. 99).

Il y a deux ans, l'équipe de R.C. Bleackley [1] montrait cependant que le granzyme B pouvait être internalisé dans la cellule en l'absence de perforine. La perforine restait néanmoins nécessaire à sa fonction biologique, à savoir l'induction de la dégradation de l'ADN de la cellule, fonction bien établie par les modèles de souris déficientes [2]. Autrement dit, la perforine n'était pas nécessaire à l'entrée du granzyme B dans la cellule, mais demeurait en revanche indispensable à sa libération des compartiments d'endocytose dans le cytoplasme de la cellule cible, étape clé du déclenchement du programme apoptotique (qu'il soit dépendant ou non de l'activation des caspases) [3].

Ces travaux conduisirent à suspecter fortement l'existence d'un récepteur du granzyme B à la surface de la cellule cible, l'entrée de la molécule étant réalisée par endocytose, dépendante du récepteur (*figure 1*).

Ce récepteur vient d'être identifié par Motyka *et al.* [4], c'est le récepteur du mannose 6 phosphate/*insu*

*lin like growth factor II* (IGF II), déjà connu pour cibler les acides hydrolases vers les lysosomes à la sortie du trans Golgi, ainsi que les granzymes A et B vers les granules cytotoxiques [5]. C'est aussi le récepteur de l'IGFII, permettant sa clairance, celui d'autres facteurs de croissance comme le TGF $\beta$ , et une des voies d'internalisation de certains agents infectieux [6].

L'identification du récepteur du granzyme B arrive ainsi au terme d'une décennie de travaux qui a profondément modifié la compréhension des bases moléculaires de la mort cellulaire induite par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules *natural killer* (NK). En effet, si le phénomène de cytotoxicité par l'exocytose des constituants des granules cytotoxiques contenus dans les lymphocytes T avait été énoncé au milieu des années 1980, c'est la découverte des molécules impliquées (en particulier la perforine et les granzymes), le clonage de leurs gènes respectifs, l'étude de leur expression *in vivo*, l'obtention de souris déficientes pour la perforine, le granzyme B, le granzyme A, puis la découverte et l'analyse de la voie Fas/FasL, qui ont permis la démonstration du rôle fondamental de ce mécanisme dans l'élimination des cellules présentant des antigènes du non-soi ou du soi modifié ainsi que dans la régulation de la réponse immunitaire [7]. C'est donc bien l'approche moléculaire qui a été déterminante dans la compréhension de ce phénomène biologique fondamental, et l'identification du récepteur du granzyme B est une étape importante de plus.

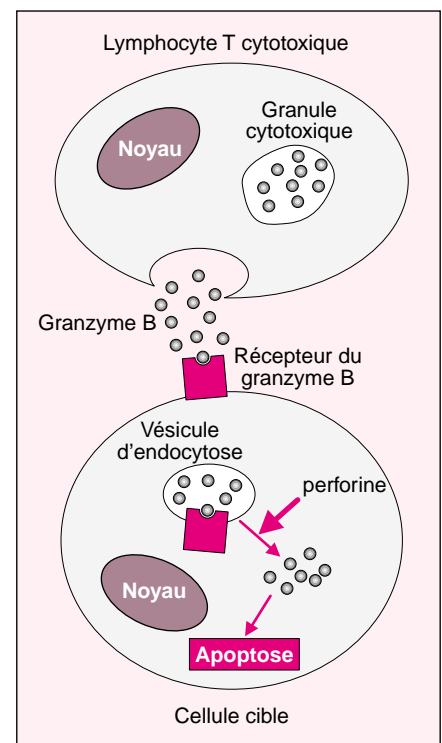


Figure 1. **Action combinée du granzyme B et de la perforine dans l'induction de la mort par apoptose de la cellule cible.** Le granzyme B et la perforine sont contenus dans les granules cytotoxiques des lymphocytes T cytoxiqes et libérés par exocytose dans l'espace eaeffecteur cible. Le granzyme B se fixe sur le récepteur du mannose 6 phosphate de la cellule cible, ce qui permet son internalisation. La perforine permet la libération du granzyme B du compartiment d'endocytose vers le cytoplasme, nécessaire à son action apoptotique.

Les efforts de plusieurs équipes pour obtenir du granzyme B recombinant *in vitro*, afin d'étudier isolément sa fonction, ont abouti récemment. C'est dans ce contexte que Motyka *et al.* [4], furent surpris de constater que le granzyme B recombinant n'était pas biologiquement actif, contrairement au granzyme B purifié à partir de granules cytotoxiques de lignée T, alors que leurs activités enzymatiques étaient comparables. Ils évoquèrent donc la possibilité d'une modification post-traductionnelle. Effectivement, le granzyme B purifié traité par une phosphatase garde son activité enzymatique, mais perd sa capacité de se fixer sur des cellules de Jurkatt. Si l'hypothèse de l'existence d'un récepteur est exacte, l'absence de fixation sur la cellule cible devrait s'accompagner d'un défaut d'induction de la mort de la cellule. C'est effectivement ce qui est observé, permettant de conclure que le granzyme B biologiquement actif est sous forme phosphorylée.

Dans un deuxième temps, les auteurs montrent que le granzyme B ne peut se fixer sur des cellules n'exprimant pas le récepteur du mannose 6-phosphate (MPR), mais que cette fixation, ainsi que la sensibilité des cellules à la lyse, est restaurée après transfection de l'ADNc codant pour le récepteur. Dans un modèle d'induction de l'apoptose par l'adénovirus déficient de type 2 (qui permet la libération du granzyme B et sa translocation nucléaire), l'addition de mannose 6-phosphate inhibe la fixation du granzyme B, son internalisation, et sa capacité de provoquer l'apoptose des cellules. Enfin, quand des cellules n'exprimant pas le récepteur du mannose 6-phosphate sont mises en présence de lymphocytes T cytotoxiques, on n'observe plus de dégradation de leur ADN, conséquence connue de la fonction biologique du granzyme B. Ainsi, l'ensemble de ces résultats

apporte la démonstration que l'activité biologique du granzyme B est directement corrélée à son interaction avec le récepteur du mannose 6-phosphate. L'expérience déterminante est la réalisation d'un modèle de transplantation de cellules en situation allogénique chez la souris. Les cellules exprimant le récepteur du mannose 6-phosphate sont rejetées en une semaine, tandis que les mêmes cellules déficientes pour ce récepteur échappent totalement au rejet, alors même que l'importance de l'infiltrat lymphocytaire est identique. L'absence d'expression du récepteur du mannose 6-phosphate pourrait ainsi permettre aux cellules d'échapper à la cytotoxicité à médiation cellulaire. Le récepteur du mannose 6-phosphate joue donc un rôle-clé dans la liaison et l'internalisation du granzyme B, et dans les mécanismes conduisant à la mort des cellules cibles allogéniques. Ceci souligne l'importance des médiateurs de l'exocytose granulaire dans le rejet des allogreffes, en particulier le granzyme B. Ainsi, l'identification du récepteur membranaire du granzyme B ouvre de nouvelles perspectives d'intervention sur la fonction des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK.

L'observation de mutations du gène codant pour le récepteur du mannose 6-phosphate dans divers tumeurs permet d'évoquer l'hypothèse selon laquelle les cellules tumorales, en l'absence de récepteur exprimé à leur surface, pourraient échapper à la surveillance immunitaire. Enfin, la sécrétion de récepteur soluble par des cellules cancéreuses pourrait également, à l'image du récepteur du TNF ou du FasL soluble [8], être un moyen d'échapper à l'immunité à médiation cellulaire, dépendante de l'exocytose granulaire.

De nombreuses autres questions demeurent, concernant les voies de

signalisation induites par l'interaction du granzyme B avec son récepteur au niveau de la membrane cellulaire, ou encore son rôle physiologique dans l'interaction avec le granzyme B soluble [9] et dans l'homéostasie tissulaire [10].

1. Pinkoski M, Hobman M, Heiben J, *et al.* Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood* 1998; 92: 1044-54.
2. Heusel J, Wesselschmidt R, Shresta S, Russell J, Ley T. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 1994; 76: 977-87.
3. Trapani J, Davis J, Sutton V, Smyth M. Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents *in vitro* and *in vivo*. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 323-9.
4. Motyka B, Korbitt G, Pinkoski M, *et al.* Mannose 6-phosphate/Insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 2000; 103: 491-500.
5. Griffiths G, Isaacs S. Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol* 1993; 120: 885-96.
6. Brunetti CR, Dingwell KS, Wale C, Graham FL, Johnson DC. Herpes simplex virus gD and virions accumulate in endosomes by mannose 6-phosphate-dependent and -independent mechanisms. *J Virol* 1998; 72: 3330-9.
7. Kägi D, Ledermann D, Bürki K, Zingernagel R, Hentgartner H. Lymphocyte-mediated cytotoxicity *in vitro* and *in vivo*: mechanisms and significance. *Immunological Rev* 1995; 146: 95-115.
8. Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, *et al.* Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996; 274: 1363-6.
9. Spaeny-Dekking E, Hanna W, Wolbink A, *et al.* Extracellular granzymes A and B in humans: detection of native species during CTL responses *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 1998; 160: 3610-6.
10. Berthou C, Zhang Y, Sasportes M. Le granzyme B: une protéase essentielle de la réponse inflammatoire. *Path Biol* 1998; 46: 617-24.

#### Alain Wargnier

Service de microbiologie et Inserm U. 462, Hôpital Saint-Louis, 1, rue Claude-Vellefaux, 75475 Paris Cedex 10, France.