

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**IMPLICATION DU CD45 DANS L'ACTIVATION ET LA LOCALISATION DU
DFF40 CHEZ LES LYMPHOCYTES T**

Par
Geneviève Dupéré-Minier

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Dr. Michel Fournier
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Dr. Michel Tremblay
CHUL, Québec

Directeur de recherche

Dr. Jacques Bernier,
INRS-Institut Armand-Frappier

Résumé

Les travaux de notre laboratoire sur l'induction de l'apoptose par des agents perturbant le potentiel mitochondrial ont permis de mettre en évidence l'importance de la tyrosine phosphatase CD45. En absence du CD45, un régulateur de l'activité de plusieurs membres de la famille des tyrosines kinases Src, il y a inhibition de l'apoptose nucléaire bien que l'activation de la caspase-3 et le clivage du DFF45 ont lieu. Notre hypothèse est que l'absence du CD45 est responsable de l'activation inadéquate de l'endonucléase DFF40. Cette hypothèse repose sur l'importance des efflux de chlore pour la fragmentation de l'ADN, le rôle de la famille des tyrosines kinases Src dans la fonction de ces canaux et l'activité régulatrice du CD45 sur ces kinases. Le but du projet d'étude est d'identifier le rôle du CD45 dans l'activation du DFF40 chez des lymphocytes exposés à des perturbateurs mitochondriaux. Nous avons exposé des lymphocytes T HPBALL (CD45+) et HPB45.0 (CD45-) à des agents chimiques induisant l'apoptose. La localisation du DFF40 a été déterminée dans les fractions cytosoliques et nucléaires. Le volume cellulaire, le flux ionique et l'acidification intracellulaire ont été déterminés par cytométrie en flux. Pour vérifier l'importance de l'homéostasie ionique, des milieux hypo- et hypertoniques ont été utilisés. L'implication de l'activation des canaux de chlore par phosphorylation sur les résidus tyrosine a été évaluée par immunobuvardage de type western. Chez les HPB45.0, il y a absence de l'activité du DFF40 et perturbation de sa migration vers le noyau. Associées à ces changements, il y a diminution de la perte de volume et de l'acidification intracytoplasmique. L'analyse des canaux de chlore, à la suite de leur immunoprécipitation démontre une absence de la phosphorylation sur les résidus tyrosine chez les cellules CD45-. Le CD45 joue donc un rôle important dans la régulation des canaux de chlore et dans la régulation ionique de la cellule en perturbant l'activité des canaux de chlore régulée par la famille Src. La perturbation des efflux de chlore expliquerait l'absence d'activité du DFF40 et de sa localisation intracytoplasmique.



Étudiante



Directeur de recherche

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Jacques Bernier, de m'avoir fait confiance malgré les connaissances plutôt légères que je détenais en janvier 2002, puis pour m'avoir guidée, encouragée et conseillée durant ces deux années. Merci pour la gentillesse, la compréhension et la confiance qu'il a manifestées à mon égard durant ma maîtrise. Merci Jacques pour ta patience et pour tout ce que tu m'as appris.

Je veux également souligner les contributions de mes coéquipiers de laboratoire : Claudine Hamelin, Michele d'Elia, Julie Patenaude et Philippe Desharnais. Merci pour votre patience, pour les techniques que vous m'avez apprises et pour les réponses à mes nombreuses questions. Spécialement merci à Claudine pour son aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

Merci à ceux qui me sont les plus chers, mes parents, Pierre et Isabelle, ainsi que mon conjoint, Toni. Merci pour votre appui, votre soutien, votre patience de tous les jours et pour m'avoir encouragée à continuer dans les moments difficiles et de stress.

Je veux remercier également la Fondation Armand-Frappier pour le soutien financier dans l'exécution de ces travaux.

Table des matières

Résumé	iii
Remerciements	iv
Liste des figures et des tableaux.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Introduction	1
SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	3
MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE : L'APOPTOSE.....	4
1.1 Introduction	4
1.2 Voies d'induction de l'apoptose	6
1.2.1 Voie de la mitochondrie	6
1.2.2 Voie des récepteurs de mort.....	8
1.2.2.1 Contrôle de la signalisation des récepteurs de mort.....	10
1.3 Les gènes régulateurs de l'apoptose : membres de la famille de Bcl-2.....	11
1.3.1 Régulation de la perméabilité membranaire mitochondriale	13
1.3.2 Implication dans la voie des récepteurs de mort	14
1.4 Les caspases : exécutrices centrales de l'apoptose	15
1.4.1 Structure des différentes caspases	15
1.4.2 Mécanisme d'activation des caspases	16
1.4.3 Substrats des caspases	18
1.4.4 Régulation de l'activité et du processus des caspases.....	19
1.5 Les endonucléases : fragmentation de l'ADN génomique	20
1.5.1 Le DFF40 : facteur de fragmentation de l'ADN	21
1.6 Phagocytose des cellules apoptotiques.....	24
LE CD45 : IMPLICATION DANS L'APOPTOSE DES CELLULES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	26
2.1 Structure et différents isoformes du CD45	26
2.2 Membres de la famille Src impliqués dans l'activation des lymphocytes T	27

2.3 Importance du CD45 dans l'activation des lymphocytes T	29
2.3.1 Régulation de la famille Src par le CD45	30
2.3.2 Autres substrats du CD45.....	32
2.4 Régulation de l'activité du CD45	32
2.5 Implication du CD45 dans l'apoptose des lymphocytes T	33
2.5.1 Liaison du CD45 par des anticorps monoclonaux	34
2.5.2 Liaison du CD45 par son ligand naturel, la galectine-1	35
2.5.3 Implication du CD45 dans l'apoptose médiée par Fas.....	37
2.5.4 Implication du CD45 dans l'apoptose induite par des agents chimiques.....	39
 LES CANAUX DE CHLORE : RESPONSABLE DE L'HOMÉOSTASIE IONIQUE	 40
3.1 Les principaux canaux de chlore et leurs propriétés	40
3.1.1 Le canal régulateur transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR)	41
3.1.2 Les canaux récepteurs de chlore de type GABA et glycine	42
3.1.3 La famille des canaux de chlore (ClC).....	42
3.1.4 Les canaux de chlore activés par un gonflement (VRAC).....	46
3.1.5 Les canaux de chlore activés par le calcium (CACC).....	47
3.2 Expression des canaux de chlore chez les lymphocytes	47
3.2.1 Mécanisme de la régulation ionique par les ions Cl ⁻	48
3.2.2 Importance de la régulation ionique dans l'apoptose.....	50
3.3 Régulation des canaux de chlore	54
 SECTION 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE	 57
Conclusion	90
ANNEXE	97
Travaux non inclus dans l'article	98
Liste des références	99

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Principales voies d'induction de l'apoptose menant à l'activation des caspases effectrices : la voie de la mitochondrie et la voie des récepteurs de mort.....	8
Figure 2 : Mécanisme proposé de l'activation du DFF40.....	23
Figure 3 : Différences structurales par épissage alternatif de deux isoformes du CD45 : CD45RABC et CD45RO	27
Figure 4 : Régulation réciproque de la protéine tyrosine kinase p56 ^{lck} par le CD45 et Csk.....	31
Figure 5 : Les trois sous-classes de la famille des canaux de chlore et leurs principales expressions.....	44
Figure 6 : Modèle schématique des relations entre les mécanismes de régulation du volume cellulaire (RVD, RVI et AVD) et le processus apoptotique menant à la mort cellulaire.....	52
Figure 7 : Détermination du clivage du DFF45 ainsi que de la localisation intracellulaire du DFF40 et du DFF45 lors de l'induction de l'apoptose par le TBT.....	98
Tableau I : Principaux substrats des caspases.....	17

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	Facteur inducteur de l'apoptose « Apoptosis-inducing factor »
APAF-1	Facteur d'activation 1 des protéases apoptotiques « Apoptotic protease activating factor 1 »
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
AVD	Diminution de volume lors de l'apoptose « Apoptotic volume decrease »
Bcl	Lymphome des cellules B « B cell lymphoma »
BH	Région homologue à Bcl-2 « Bcl-2 homology region »
BIR	Domaine de répétition IAP baculoviral « Baculoviral IAP repeat »
CACC	Canaux de chlore activés par le calcium « calcium-activated chloride channels »
CAD	Désoxyribonucléase (DNase) activée par les caspases « Caspase-activated DNase »
CAMKII	Protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline II « Calcium/calmodulin-dependent kinase II »
CARD	Domaine de recrutement des caspases « Caspase recruitment domain »
Cbp	Protéine liant Csk « Csk-binding protein »
CD	Groupe de différenciation « Cluster of differentiation »
CD45-AP	Protéine associée au CD45 « CD45-associated protein »
Ced	Gène de mort du <i>Caenorhabditis elegans</i> « <i>Caenorhabditis elegans</i> death gene »
CFTR	Canal régulateur transmembranaire de la fibrose kystique « Cystic fibrosis transmembrane regulator »
CIC	Famille des canaux de chlore « Chloride channel family »
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
Csk	C-terminal Src kinase
Da	Dalton
dATP	Désoxyadénoside triphosphate
DD	Domaine de mort « Death domain »
DED	Domaine effecteur de mort « Death effector domain »
DFF40	Facteur de fragmentation de l'ADN 40 « DNA fragmentation factor 40 »
DFF45	Facteur de fragmentation de l'ADN 45 « DNA fragmentation factor 45 »
DIABLO	Protéine liant directement IAP et détenant un point isoélectrique faible « Direct IAP binding protein with low isoelectric point [pI] »
DISC	Complexe de signalisation induisant la mort « Death-inducing signalling complex »
DNase	Désoxyribonucléase « Deoxyribonuclease »
Erk	Kinase régulée par un signal extracellulaire « Extracellular signal-regulated kinase »
FADD	Protéine associée à Fas avec un domaine de mort « Fas-associated protein with death domain »

FAP-1	Phosphatase associée à Fas 1 « Fas-associated phosphatase-1 »
GEM	Membranes enrichies de glycosphingolipides « Glycolipid-enriched membrane »
HMG-1/2	Groupe de protéines à mobilité élevée 1/2 « High mobility group protein-1/2 »
IAP	Protéines inhibitrices de l'apoptose « Inhibitor of apoptosis protein »
ICAD	Inhibiteur de la DNase activée par les caspases « Inhibitor of caspase-activated DNase »
ICE	Enzyme de conversion de l'interleukine-1 β « Interleukin-1 β converting enzyme »
IL	Interleukine
ITAM	Motifs d'activation de tyrosine du récepteur immunologique « Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs »
JNK	Kinase Jun « Jun kinase »
kDa	Kilo Dalton
kpb	Kilo paires de bases
MAPK	Protéine kinase activée par des mitogènes « Mitogen-activated protein kinase »
MEKK	MAPK/Erk kinase kinase
Mpb	Méga paires de bases
NF-κB	Facteur nucléaire- κ B « Nuclear factor- κ B »
ORCC	Canaux de chlore rectifiants sortants « Outwardly rectifying chloride channels »
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PK	Protéine kinase
pb	Paire de bases
pS	Pico Siemens
PS	Résidus phosphatidylsérine
PTP	Pore transitoire à la perméabilité
PTPase	Protéine tyrosine phosphatase
RAIDD	Protéine associée à RIP homologue à ICH-1/Ced-3 avec un domaine de mort « RIP-associated ICH-1/Ced-3 homologous protein with death domain »
RING	Gène nouveau très intéressant « Really interesting new gene »
RIP	Protéine interagissant avec les récepteurs « Receptor-interacting protein »
RVD	Diminution régulatrice du volume « Regulatory volume decrease »
RVI	Augmentation régulatrice du volume « Regulatory volume increase »
SH	Région d'homologie à Src « Src homology region »
SIDA	Syndrome d'immuno-déficience acquise
Smac	Seconde protéine mitochondriale activant les caspases « second mitochondria-derived activator of caspases »
TCR	Récepteur des lymphocytes T « T cell receptor »
TNF	Facteur nécrosant les tumeurs « Tumor necrosis factor »
TNFR	Récepteur du TNF α « TNF α receptor »

TRADD	Protéine associée au récepteur du TNF avec un domaine de mort « TNF receptor-associated protein with death domain »
VRAC	Canaux de chlore activés par un gonflement « Volume-regulated anion channels »
WD-40	Domaine de répétition « Repeat region »
ZAP-70	Protéine de 70 kDa associée aux chaînes zêta « Zeta chain-associated protein of 70 kDa »

Introduction

L'apoptose est un processus de mort cellulaire génétiquement contrôlé dont l'altération mène à plusieurs pathologies. L'apoptose se distingue par plusieurs caractéristiques biochimiques incluant la diminution du volume cellulaire, une acidification intracellulaire, une perte de l'intégrité de la membrane plasmique, la formation de corps apoptotiques et la fragmentation de l'ADN. Plusieurs stimuli peuvent initier l'apoptose dont les agents chimiques qui induisent une perturbation de la mitochondrie, un joueur central dans l'apoptose. La perturbation de la mitochondrie est associée à une transition du potentiel membranaire mitochondrial, le relâchement du cytochrome c et du facteur inducteur de l'apoptose (AIF). Dans le cytosol, le cytochrome c forme un complexe multiprotéinique menant à l'activation de caspases, un événement clé dans le processus apoptotique. Les caspases clivent plusieurs substrats cellulaires menant aux principaux changements morphologiques de l'apoptose. Parmi ces changements, la caspase-3 intervient dans les altérations nucléaires en clivant le DFF45, la sous-unité inhibitrice du facteur de fragmentation de l'ADN 40, le DFF40. Le DFF40 est la principale endonucléase responsable de la fragmentation de l'ADN au cours de l'apoptose.

Notre laboratoire a démontré l'implication du CD45, une tyrosine phosphatase, dans l'apoptose nucléaire induite par une perturbation de la mitochondrie suite à une exposition à des agents chimiques. Contrairement à des lymphocytes T normaux, des lymphocytes T déficients pour l'expression du CD45 sont résistants à la fragmentation de l'ADN après une exposition à des agents chimiques. Chez les deux types de cellules, plusieurs voies biochimiques de l'apoptose sont détectées dont la mobilisation du calcium intracellulaire, une réduction du potentiel membranaire mitochondrial, le relâchement du cytochrome c, la dégradation d'I κ B- α , l'activation de la caspase-3 et le clivage du DFF45. À la suite de ces observations, le but de la présente étude est de déterminer le rôle du CD45 dans l'apoptose nucléaire. Le CD45 est une phosphatase jouant un rôle primordial dans la signalisation intracellulaire médiée par l'engagement du TCR. Ce rôle est attribuable à la régulation de deux substrats majeurs, les protéines tyrosines kinases

p56^{lck} et p59^{fyn}, deux membres de la famille Src. Tandis que ces deux membres de la famille Src sont régulés par le CD45, les membres de cette famille sont connus pour leur régulation des canaux de chlore. Les canaux de chlore jouent un rôle essentiel dans la réduction du volume cellulaire et dans l'acidification intracellulaire au cours de l'apoptose. Un dérèglement dans le transport des ions dans les cellules apoptotiques mène à des changements dans les concentrations intracellulaires des ions et peut perturber l'activité enzymatique de certaines protéines. Donc, le CD45 pourrait jouer un rôle dans l'apoptose nucléaire par une régulation de l'homéostasie ionique.

Pour déterminer le rôle du CD45 dans l'apoptose nucléaire, nous avons premièrement déterminé l'influence du CD45 sur la régulation ionique de lymphocytes T suite à l'induction de l'apoptose par des agents chimiques. Par la suite, nous avons évalué si les lymphocytes T déficients pour l'expression du CD45 ont un défaut d'activation des canaux de chlore. Nous avons également analysé la localisation et la migration du DFF40 chez des lymphocytes T normaux et déficients pour l'expression du CD45.

Ce mémoire comporte deux sections dont la première renferme une revue de la littérature sur les connaissances actuelles concernant les sujets étudiés au cours de ma maîtrise. En premier lieu, l'apoptose générale sera abordée dont les principales voies d'induction de l'apoptose, les gènes régulateurs de l'apoptose, les protéines enzymatiques nécessaires à l'exécution de cette mort cellulaire ainsi que les différentes nucléases impliquées dans l'apoptose nucléaire. En deuxième lieu, une description du récepteur CD45 sera mise en évidence suivie du rôle de ce récepteur dans les lymphocytes du système immunitaire et de son implication dans l'apoptose. Finalement, cette section mettra l'accent sur une description des différents canaux de chlore, l'implication de ces canaux dans l'homéostasie ionique des cellules, l'importance de la régulation ionique dans l'apoptose ainsi que la régulation des canaux de chlore. La deuxième section comprend l'ensemble des travaux effectués au cours de ma maîtrise qui a fait l'objet d'un article scientifique. Par la suite, une conclusion analysera l'ensemble des résultats obtenus.

SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE 1

MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE : L'APOPTOSE

1.1 Introduction

Les organismes multicellulaires doivent se débarrasser naturellement de leurs cellules nuisibles, en excès ou potentiellement dangereuses. À cette fin, ils utilisent un programme de mort cellulaire appelé apoptose, un processus actif encodé dans les chromosomes de toutes les cellules nucléées. L'apoptose est un mécanisme de suicide cellulaire finement régulé, impliqué dans le contrôle des populations de cellules, de la grosseur des tissus et de l'homéostasie du développement normal des organismes (Hengartner, 2000). La découverte du processus de la mort cellulaire programmée a été faite par le chercheur Carl Vogt en 1842. L'intérêt sur ce type de mort cellulaire vient des travaux de Kerr, Wyllie et Currie en 1972 qui ont distingué deux types de mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose (Peter, Heufelder et Hengartner, 1997).

Les deux types de mort cellulaire se différencient par la cascade d'événements biochimiques les caractérisant. La taille des cellules mourant par nécrose augmente par une accumulation d'eau et de sodium dans le cytosol. La membrane plasmique des cellules se désintègre et le contenu cytosolique est libéré dans l'environnement causant une réponse inflammatoire locale. La mort par nécrose se produit lorsque les cellules sont exposées à une hyperthermie, une hypoxie, une ischémie, un poison métabolique ou un traumatisme cellulaire (Fadell, Orrenius et Zhivotovsky, 1999). L'apoptose est un processus autonome cellulaire impliqué dans l'élimination des cellules infectées, vieilles ou non nécessaires. Morphologiquement, ce processus est caractérisé par une diminution du volume de la cellule, un bourgeonnement de la membrane plasmique, une perte de l'asymétrie membranaire, l'expression des résidus phosphatidylsérine à la surface membranaire, un détachement des cellules avoisinantes, une perte de microvillosités, une condensation de la chromatine, un clivage de l'acide désoxyribonucléique (ADN) au niveau des jonctions internucléosomales en fragments de 180 à 200 paires de bases (pb)

ainsi que la formation de corps apoptotiques (Cohen, 1993; Walker *et al.*, 1999). Contrairement à la nécrose, l'apoptose ne crée pas de réponse inflammatoire grâce à la phagocytose des corps apoptotiques. Dépendamment de la rigueur des stimuli, la cellule va mourir soit par apoptose ou par nécrose, cette dernière étant favorisée lors de chocs plus sévères (Proskuryakov, Konoplyannikov et Gabai, 2003).

Les travaux sur le nématode *Caenorhabditis elegans* ont fourni les premiers indices selon lesquels il y aurait des gènes impliqués dans la mort cellulaire programmée (Ellis, Yuan et Horvitz, 1991; Horvitz, 1999). L'étude des gènes de ce nématode a confirmé que les changements morphologiques attribuables à l'apoptose nécessitent l'activité de certaines protéines. Avant d'atteindre sa pleine maturité, 131 des 1090 cellules de ce nématode meurent par apoptose (Shaham et Horvitz, 1996). Parmi les 14 gènes reconnus, quatre ont été identifiés comme responsables du mécanisme de l'apoptose chez le *Caenorhabditis elegans* : Ced-3, Ced-4 et Egl-1 favorisant l'apoptose ainsi que Ced-9 un gène anti-apoptotique (Tittel et Steller, 2000). Deux de ces quatre gènes sont essentiels pour le processus de mort, c'est-à-dire les gènes Ced-3 et Ced-4. Le gène Ced-3 est l'homologue de l'enzyme de conversion de l'interleukine-1 β (IL-1 β) chez les mammifères (Yuan *et al.*, 1993). Une fois activé, le Ced-3 active à son tour des substrats pour détruire la cellule. Le gène Ced-4 est l'homologue du facteur d'activation 1 des protéases apoptotiques (APAF-1) et il peut interagir avec Ced-3 ainsi que Ced-9. Le Ced-9 est l'homologue de Bcl-2 qui a pour fonction de prévenir la mort, tandis que le gène Egl-1 est un membre pro-apoptotique de la famille de Bcl-2 (Bergmann, Agapite et Steller, 1998; Del Peso *et al.*, 2000).

L'apoptose fait partie intégrante des réactions physiologiques normales d'un bon nombre d'organismes allant des plantes jusqu'aux mammifères. Toute anomalie de ce mécanisme régulateur peut être à l'origine de nombreuses pathologies. Certaines perturbations sont liées à une inhibition de l'apoptose (cancer, réactions d'auto-immunité) alors que d'autres sont associées à une stimulation de ce phénomène (SIDA, maladies neurodégénératives) (Kam et Ferch, 2000; Thompson, 1995).

1.2 Voies d'induction de l'apoptose

L'apoptose peut être induite par différents facteurs comme certaines hormones, un choc thermique, une carence en facteurs de croissance cellulaire, des radiations, des agents endommageant l'ADN ou une signalisation intracellulaire suite à l'engagement de protéines de surface spécialisées (Kam et Ferch, 2000). Cette mort cellulaire se déroule en une cascade d'événements où trois phases se succèdent : la phase d'initiation, de régulation, et celle de destruction (Ségal-Bendirdjian, 1999). Durant la première phase, la cellule reçoit un signal initiateur activant la cascade de réactions conduisant à la mort programmée. L'activation de ce signal mène à la phase de régulation qui permet la propagation du signal apoptotique. Cette phase est régulée par des médiateurs intracellulaires (activation de gènes pro-apoptotiques et répression de gènes anti-apoptotiques) qui détermineront le devenir de la cellule. En effet, à cette étape certaines protéines anti-apoptotiques peuvent permettre le sauvetage de la cellule. Finalement, dans l'étape finale, qui est irréversible, la propagation du signal apoptotique conduit à la phase de dégradation impliquant l'activation de caspases effectrices et d'endonucléases (Ségal-Bendirdjian, 1999). Les caspases sont des protéines riches en cystéine ayant une activité protéase et elles seront le sujet de discussion plus loin. L'apoptose peut être initiée par deux voies : la voie de la mitochondrie et la voie des récepteurs de mort (Gottlieb, 1999).

1.2.1 Voie de la mitochondrie

La mitochondrie est un organite clé, quasi incontournable, dans le processus apoptotique. En effet, la mitochondrie joue un rôle central au sein de cette mort cellulaire programmée et, à l'exception d'une activation par un signal extrinsèque, toutes les voies apoptotiques passent par le centre énergétique de la cellule. De nombreuses protéines localisées au niveau de la mitochondrie sont nécessaires à la propagation du signal apoptotique (Ashe et Berry, 2003).

De nombreux facteurs peuvent induire l'apoptose par une perturbation de la mitochondrie. Certaines drogues de chimiothérapie, les agents toxiques et les dommages

à l'ADN se retrouvent parmi ces facteurs (Loeffler et Kroemer, 2000). Lors d'une perturbation de la mitochondrie, le cytochrome c, normalement confiné dans l'espace intermembranaire, est relâché. Dans le cytosol, le cytochrome c interagit en présence d'ATP ou de dATP avec APAF-1 et la caspase-9 pour former l'apoptosome (Ashe et Berry, 2003). La molécule APAF-1, une protéine de 130 kDa, est formée d'un domaine de recrutement de caspases (CARD) à sa région N-terminale et d'un domaine de répétition WD-40 à sa région C-terminale (Cain, Bratton et Cohen, 2002). Le domaine WD-40 possède une fonction d'inhibition de la molécule APAF-1. Durant l'apoptose, le cytochrome c et le dATP enlèvent l'action inhibitrice du domaine WD-40 pour permettre l'oligomérisation de la molécule APAF-1 (Laubert *et al.*, 2001). Subséquemment, le domaine CARD permet d'interagir avec la pro-caspase-9 (Hu *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1999). La caspase-9 active permet à son tour l'activation des caspases 3 et 7 conduisant à la destruction de la cellule par une signalisation protéolytique (Figure 1). La molécule Smac/DIABLO est également relâchée dans le cytosol par la mitochondrie lors d'un stimulus apoptotique. Cette molécule se lie au domaine de répétition IAP baculoviral (BIR) des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP). Cette liaison permet d'enlever l'effet inhibiteur des protéines IAP sur les caspases (Verhagen et Vaux, 2002).

Le facteur inducteur de l'apoptose (AIF) est également impliqué dans l'apoptose par la voie de la mitochondrie. Ce facteur est une flavoprotéine libérée de la mitochondrie et transportée dans le noyau de la cellule lors de l'apoptose. Une surexpression d'AIF induit une condensation de la chromatine, une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial, l'exposition des résidus phosphatidylsérine à la surface de la membrane plasmique ainsi qu'une fragmentation de l'ADN en haut poids moléculaire (50 kpb) (Ashe et Berry, 2003; Van Gurp *et al.*, 2003). Cette protéine procède indépendamment des caspases, mais agit en coopération pour la promotion de l'apoptose nucléaire (Susin *et al.*, 2000).

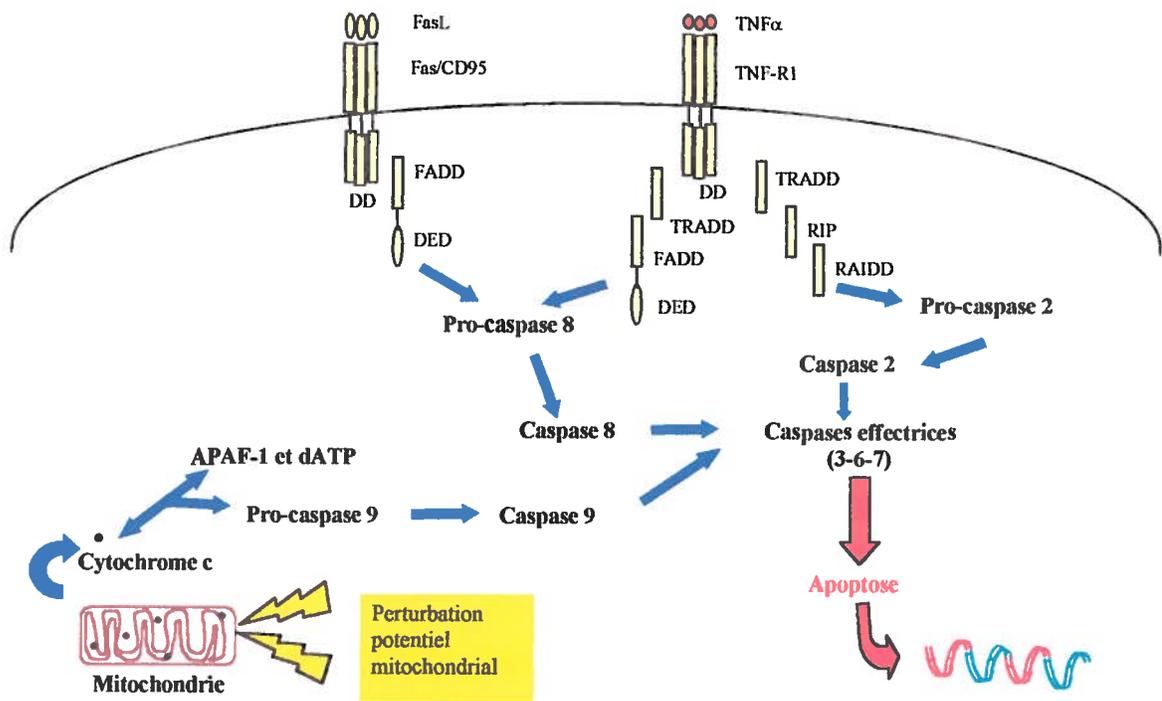


Figure 1 : Principales voies d'induction de l'apoptose menant à l'activation des caspases effectrices : la voie de la mitochondrie et la voie des récepteurs de mort.

(Modifié d'Ashkenazi et Dixit, 1998; Gottlieb, 1999)

1.2.2 Voie des récepteurs de mort

Une seconde voie menant à l'apoptose implique les récepteurs de mort, des protéines cellulaires de surface auxquelles vont se lier des ligands de mort spécifiques. Ces récepteurs de mort cellulaire appartiennent à la superfamille des récepteurs du facteur nécrosant les tumeurs (TNFR). Les principaux membres caractérisés de la famille du TNFR sont TNFR1 (ou p55, CD120a) et Fas (ou CD95, Apo 1). D'autres membres moins connus font également partie de cette famille : CAR 1, DR3 (ou Apo 3, WSL-1, TRAMP, LARD), DR4 et DR5 (ou Apo 2, TRAIL-R2, TRICK 2, KILLER) (Ashkenazi et Dixit, 1998). Les membres de la famille du TNFR sont des protéines transmembranaires de

type I contenant dans leur partie extracellulaire d'une à six régions riches en cystéine. Ils possèdent également une portion cytoplasmique homologue nommée domaine de mort (DD ou « death domain »). Par l'intermédiaire de la séquence d'environ 80 acides aminés du DD, le récepteur peut activer la machinerie apoptotique (Itoh et Nagata, 1993). De façon générale, l'activation des récepteurs se fait par leur oligomérisation recrutant près de la membrane des protéines adaptatrices capables de s'associer aux DD par l'intermédiaire de leur propre DD (Ashe et Berry, 2003). La famille des ligands du TNFR comprend une quinzaine de membres, des molécules reliées structurellement dont: FasL liant Fas; TNF et la lymphotoxine α liant TNFR1; Apo 3L liant DR3; Apo 2L liant DR4 et DR5. Ces ligands sont, en grande majorité, des protéines transmembranaires de type II qui présentent leur extrémité C-terminale du côté extracellulaire. Leur domaine extracellulaire est formé d'environ 150 acides aminés et possède de 20 à 25 % d'homologie avec la famille du TNFR (Ashkenazi et Dixit, 1998).

Lors de la stimulation de Fas par son ligand spécifique, sa trimérisation permet le recrutement d'une protéine adaptatrice qui contient un domaine de mort (FADD). FADD présente la particularité de posséder, en plus de son DD, un domaine effecteur de mort cellulaire (DED ou « death effector domain ») dans sa région N-terminale. FADD a un rôle important dans le recrutement de la pro-caspase-8 par son DED. L'ensemble de ces protéines forme, avec le récepteur, un complexe de signalisation induisant la mort nommé DISC. Une fois la pro-caspase-8 recrutée, elle subit un clivage protéolytique la rendant active c'est-à-dire la caspase-8. Il en résulte à une activation séquentielle de caspases qui clivent des protéines essentielles à la survie de la cellule (Figure 1) (Depraetere et Golstein, 1997; Rieux-Laucat, 2000).

Les autres membres de la famille du TNFR interagissent similairement. Un autre exemple est la trimérisation du TNFR1 par son ligand qui permet le recrutement de la molécule adaptatrice TRADD. Cette molécule associée au TNFR1 par son DD, recrute à son tour FADD et la pro-caspase-8 (Hsu, Xiong et Goeddel, 1995). Par contre, TRADD peut également favoriser la survie de la cellule en se liant avec une protéine interagissant avec les récepteurs (RIP) et activant ainsi le facteur de transcription NF- κ B (Ashe et

Berry, 2003). RIP est une protéine sérine/thréonine kinase qui peut également induire l'apoptose via l'interaction de son DD avec une protéine homologue à ICH-1/Ced-3 associée à RIP avec un domaine de mort (RAIDD) et avec la protéine adaptatrice de RIP avec un domaine de mort (CRADD). RAIDD contient un domaine de recrutement des caspases (CARD) qui interagit avec la caspase-2 pour induire l'apoptose (Hsu *et al.*, 1996). En résumé, les complexes moléculaires associés aux récepteurs de mort induisent l'activation des caspases par l'intermédiaire des DD, DED ou CARD dans des interactions du type FADD / caspase-8; TRADD / FADD / caspase-8 et TRADD / RIP / RAIDD / caspase-2.

1.2.2.1 Contrôle de la signalisation des récepteurs de mort

Plusieurs protéines peuvent influencer l'activation des récepteurs de mort, soit par une association directe ou par l'interaction avec d'autres protéines de surface. La protéine FAP-1 par exemple, est une tyrosine phosphatase qui inhibe l'apoptose initiée par Fas en se liant aux 15 derniers acides aminés de la partie intracellulaire du récepteur. L'interaction de FAP-1 suggère qu'elle exerce son rôle d'inhibition en maintenant le domaine intracellulaire de Fas dans une conformation réfractaire à l'interaction avec FADD (Sato *et al.*, 1995). Une autre protéine produite par certains virus appelée Flip, possède deux DD qui peuvent ainsi interagir avec la molécule FADD et inhiber son recrutement au niveau du DISC (Irmeler *et al.*, 1997). La protéine DAXX se lie plutôt au DD cytosolique du récepteur Fas et active ainsi la voie de signalisation des Jun kinases (JNK) qui augmente l'induction de l'apoptose (Yang *et al.*, 1997). Tandis que la protéine FLASH fait partie intégrante du complexe DISC associé au récepteur Fas, elle est nécessaire à l'activation de la caspase-8 suite à une stimulation du récepteur (Imai *et al.*, 1999). Toso est un membre de la superfamille des immunoglobulines et possède la capacité de bloquer l'apoptose induite par les TNFR. En effet, Toso peut interagir avec d'autres protéines de surface et initier un signal anti-apoptotique jouant ainsi un rôle dans le devenir des cellules T (Hitoshi *et al.*, 1998).

1.3 Les gènes régulateurs de l'apoptose : membres de la famille de Bcl-2

Les membres de la famille de Bcl-2 sont des régulateurs centraux de l'apoptose en générant des signaux de survie et de mort à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Le premier membre de la famille à avoir été identifié est Bcl-2, isolé à partir d'un gène impliqué dans un lymphome de cellules B (Tsujimoto et Croce, 1986). Bcl-2 et ses homologues fonctionnels sont essentiels à la régulation de la cellule chez plusieurs espèces, de l'humain au nématode *Caenorhabditis elegans* (Coultas et Strasser, 2003). Chez les mammifères, ces membres possèdent tous une séquence et une région structurale d'homologies à Bcl-2 (BH) où 4 domaines BH ont été identifiés (BH1, BH2, BH3 et BH4). En se référant à leurs fonctions biologiques, les membres de la famille de Bcl-2 se divisent en deux sous-groupes : protéines anti-apoptotiques ou pro-apoptotiques. Les membres du sous-groupe anti-apoptotique incluent Bcl-2, A1/Bfl-1, Bcl-w, Bcl-x_L, Boo/Diva/Bcl-B et Mcl-1. Ils se retrouvent chez les vertébrés, les invertébrés (*C. elegans* Ced-9) et les virus (protéine E1B19kD adénovirus). Ces protéines présentent des homologies de séquences dans 3 ou 4 domaines BH (Tsujimoto, 2003). Les membres pro-apoptotiques sont premièrement Bax, Bak, Bok/Mtd, Bcl-x_S et Bcl-G_L, qui possèdent tous 2 ou 3 domaines BH et des similitudes structurales avec les protéines anti-apoptotiques. Puis Bad, Bik/Nbk, Bid, Bim/Bod, Hrk/DP5, Blk, Bmf, Bcl-G_S, Noxa et PUMA/Bbc3 sont également des membres pro-apoptotiques qui détiennent seulement une région courte BH3 (Adams et Cory, 2001).

La famille de Bcl-2 est localisée au niveau du cytoplasme principalement sur la membrane mitochondriale externe, le réticulum endoplasmique et l'enveloppe nucléaire (Borner, 2003). Les protéines sont ancrées à la surface des membranes par leur queue hydrophobe à la région C-terminale et peuvent ainsi s'insérer entre la bicouche lipidique et former des canaux (Hengartner, 2000). Les membres anti-apoptotiques inhibent l'apoptose par antagonisme de l'action des membres pro-apoptotiques. La balance entre le niveau de protéines pro- et anti-apoptotiques est ainsi responsable de l'activation de l'apoptose. L'action promotrice de l'apoptose par les membres pro-apoptotiques n'est pas tout à fait claire à ce jour. Toutefois, ces membres ont été identifiés essentiels pour

compléter le processus d'apoptose dans plusieurs systèmes (Lindsten *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2002). Cependant, il a été observé que l'expression de Bax ne peut induire, à elle seule, l'apoptose alors qu'il a été démontré que sa translocation vers la mitochondrie est une étape importante pour cette induction montrant l'importance de sa localisation (D'Sa-Eipper *et al.*, 2001; Wolter *et al.*, 1997).

Le mécanisme de régulation des membres de la famille Bcl-2 est diversifié. Il inclut le contrôle de la transcription, des modifications post-transcriptionnelles, la translocation de protéines et des interactions entre protéines. Il semble cependant que la clé de la régulation réside dans la capacité de ces protéines à former des homodimères et des hétérodimères. Les homodimères anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L se font par l'intermédiaire des domaines BH1 et BH2 (Gross, McDonnell et Korsmeyer, 1999). Les membres pro-apoptotiques contenant un domaine BH3, comme Bax ou Bak, peuvent interagir avec Bcl-2 ou Bcl-x_L par l'intermédiaire de leur domaine BH3 et inhiber leur activité protectrice (Sattler *et al.*, 1997; Zha *et al.*, 1996a). Les membres qui ne comportent qu'un seul domaine BH3, comme Bad ou Bid, ne peuvent pas former de dimères et ne possèdent pas d'activité intrinsèque. Leurs rôles pro-apoptotiques se jouent par la formation de dimères avec des membres anti-apoptotiques réduisant ainsi la capacité de ceux-ci à former des homodimères protecteurs (Li *et al.*, 1998).

En plus de leur capacité à former des dimères, l'action de la famille de Bcl-2 peut être également modulée par une régulation post-traductionnelle. L'exemple le plus caractéristique de ce type de régulation est la phosphorylation de Bad. Chez des cellules hématopoïétiques en présence d'IL-3, Bad est phosphorylé puis séquestré dans le cytosol par sa liaison avec des protéines de la famille 14-3-3 (Tzivion, Shen et Zhu, 2001). Cette phosphorylation se produit principalement lors de la liaison de la cytokine à son récepteur activant ainsi la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) qui phosphoryle Akt/PKB qui à son tour phosphoryle Bad (Zha *et al.*, 1996b). En absence d'IL-3, Bad est déphosphorylé et peut donc se libérer des protéines de la famille 14-3-3. Bad peut ainsi interagir avec Bcl-x_L et bloquer son action protectrice (Kelekar *et al.*, 1997; Zha *et al.*, 1997). Bcl-2 peut également être inactivé par phosphorylation par entre autres la voie des JNK et par Raf-1

(Datta *et al.*, 1997). Cette phosphorylation peut également être induite par un traitement à l'aide d'agents de chimiothérapie comme le Taxol (Gross, McDonnell et Korsmeyer, 1999; Kroemer, 1997).

1.3.1 Régulation de la perméabilité membranaire mitochondriale

Les protéines de la famille Bcl-2 sont connues pour leurs rôles joués dans la perturbation du potentiel mitochondrial lors de l'apoptose. Ce changement de perméabilité permet le contrôle de la libération de facteurs pro-apoptotiques depuis le compartiment intermembranaire de la mitochondrie jusqu'au cytosol par l'intermédiaire de pores transitoires à la perméabilité (PTP). Les PTP sont régulés en réponse à des signaux pro-apoptotiques et laissent ainsi passer des molécules allant jusqu'à 1500 Da (Green et Reed, 1998; Marsden et Strasser, 2003). La transition de la perméabilité s'effectue sur la membrane interne et externe de la mitochondrie. Les PTP sont composés et influencés par l'hénokinase, la créatine kinase (CK), les canaux à anion dépendants du voltage (VDAC), le translocateur à nucléotide adénine (ANT) le récepteur à benzodiazépine périphérique (PBR) et la matrice mitochondriale cyclophiline D (CycD). L'ouverture des PTP conduit à la dépolarisation de la membrane, la perturbation de la phosphorylation oxydative et au gonflement de la mitochondrie (Gross, McDonnell et Korsmeyer, 1999).

La régulation de l'ouverture des PTP par, entre autres, les membres de la famille de Bcl-2 est controversée. Plusieurs mécanismes ont été proposés et un lien étroit a été établi entre la régulation des PTP et les membres pro-apoptotiques Bax, Bak, Bim et Bid (Adams et Cory, 2001). En effet, lors d'un stimulus apoptotique, ces membres sont transloqués du cytosol vers la mitochondrie. Trois modèles ont été proposés (Adams et Cory, 2001; Ashe et Berry, 2003; Tsujimoto, 2003):

(i) Suite à leur insertion dans la membrane ils forment des canaux facilitant le transport de protéines. En effet, il existe une similitude structurale entre la protéine Bcl-x_L et la toxine diphtérique capable de former des pores dans la membrane d'une cellule.

(ii) **Ces membres interagissent avec d'autres protéines pour former des canaux.** Les membres de la famille de Bcl-2 sont connus pour interagir avec plusieurs protéines. Ils pourraient même recruter des protéines, comme les canaux à anion dépendants du voltage (VDAC), au niveau de la membrane externe de la mitochondrie pour former un pore.

(iii) **Les membres induisent une rupture de la membrane externe de la mitochondrie.** La famille de Bcl-2 contrôlerait l'homéostasie de la mitochondrie. Lors de signaux apoptotiques, les membres pro-apoptotiques induisent un gonflement de la mitochondrie menant à un déchirement de la membrane et le passage de protéines.

Ces différents mécanismes restent à être éclaircis ainsi que le rôle des membres anti-apoptotiques sur la régulation de la perméabilité mitochondriale. Par contre, il a été déterminé que l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 et de Bcl-x_L peuvent prévenir la perturbation du potentiel membranaire de la mitochondrie (Kroemer, 2003).

1.3.2 Implication dans la voie des récepteurs de mort

Il est à noter que la voie de signalisation induite par les récepteurs de mort peut diverger selon le type de cellules. Une classification du type de cellules (Type I ou II) a été faite selon la voie de signalisation induite par la liaison des récepteurs de mort (Scaffidi *et al.*, 1998). Chez les cellules de type I, l'induction de l'apoptose se produit indépendamment de la mitochondrie (Algeciras-Schimmich *et al.*, 2002; Ashe et Berry, 2003). La cascade d'événements induite par les récepteurs de mort active la caspase-8 qui à son tour active des caspases en aval, c'est-à-dire les caspases-3, -6 et -7. Malgré tout, l'apoptose des cellules de type I est accompagnée d'une perturbation de la mitochondrie et du relâchement du cytochrome c. Par contre, l'induction de l'apoptose n'est pas inhibée par les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Scaffidi *et al.*, 1999). Chez les cellules de type II, la caspase-8 est inadéquate pour l'activation de la caspase-3 et le recrutement de signaux intracellulaires impliquant la mitochondrie est nécessaire (Algeciras-Schimmich *et al.*, 2002). En effet, la caspase-8 clive plutôt la protéine Bid qui a une activité pro-apoptotique. La forme tronquée de Bid induit le relâchement du cytochrome c et de DIABLO de la mitochondrie. Le relâchement de la protéine DIABLO

peut inhiber l'effet protecteur de Bcl-x_L et convertir les cellules de type II en type I (Srinivasula *et al.*, 2000). Jusqu'à ce jour, un nombre limité de types cellulaires a été classé de type I ou II. Les thymocytes et les lymphocytes T périphériques sont classés de type I tandis que les hépatocytes sont classés de type II (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2002). Les cellules neuronales semblent être de type II, mais ce classement reste à être confirmée (Yin *et al.*, 2002; Ashe et Berry, 2003).

1.4 Les caspases : exécutrices centrales de l'apoptose

Le centre du processus de l'apoptose est constitué d'un système protéolytique composé d'une famille de protéases nommée caspases. Les caspases sont nommées ainsi puisqu'elles sont des protéases riches en cystéine et qu'elles possèdent une spécificité de clivage en aval d'un résidu d'acide aspartique (« cysteinyl **asp**artate-specific proteases »). Les caspases sont les principales responsables des changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose (Hengartner, 2000). La première caspase à être identifiée est la caspase-1 aussi connue sous le nom de ICE (enzyme de conversion de l'interleukine-1 β). La caspase-1 a été reconnue pour sa capacité à convertir le précurseur de l'interleukine-1 β sous sa forme active, un important médiateur de l'inflammation. À ce jour, la présence de 14 caspases a été identifiée chez les mammifères (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999). La plupart des caspases sont synthétisées sous une forme enzymatique zymogène inerte et sont alors dénommées pro-caspases. Les caspases fonctionnent selon une cascade d'activation protéolytique. Premièrement, les caspases initiatrices situées en amont sont activées par des protéines adaptatrices. Après leur activation, les caspases initiatrices activent une ou plusieurs caspases en aval, c'est-à-dire les caspases effectrices, qui clivent à leur tour plusieurs protéines cellulaires menant à la mort cellulaire par apoptose (Chang et Yang, 2000).

1.4.1 Structure des différentes caspases

Les caspases partagent des similarités au niveau de leurs séquences en acides aminés et de leur structure. Les pro-caspases sont constituées de trois domaines : un pro-

domaine N-terminal suivi d'un domaine protéase. Le domaine protéase est composé deux sous-unités : une large (~20 kDa) et une petite (~10 kDa) (Thornberry et Lazebnik, 1998). Chez certaines pro-caspases, les deux sous-unités sont séparées par une petite région de liaison composée d'environ 10 acides aminés. Les similitudes des séquences sur le domaine protéase permettent la formation de trois sous-groupes: (i) caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13 et -14; (ii) caspase-2 et -9 ; (iii) caspase-3, -6, -7, -8 et -10 (Chang et Yang, 2000). La longueur du pro-domaine des pro-caspases est variable. Les caspases initiateuses (caspase-2, -8, -9 et -10) possèdent un pro-domaine long, tandis que les caspases effectrices (caspase-3, -6 et -7) possèdent un pro-domaine court (Cain, Bratton et Cohen, 2002). Par exemple, les pro-domaines des caspases effectrices 6 et 7 contiennent 23 acides aminés tandis que le pro-domaine de la caspase initiateuse 10 en contient 219 (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999). Le domaine long des pro-caspases initiateuses est composé de régions nécessaires à l'interaction avec d'autres composantes de la cellule. En effet, les pro-caspases 8 et 10 contiennent un domaine effecteur de mort (DED) et interagissent comme vu précédemment avec les protéines adaptatrices de la famille du TNFR dont FADD et TRADD. De plus, le domaine de recrutement des caspases (CARD) se retrouve chez la pro-caspase-1, -2, -4 et -9 et est nécessaire à l'interaction entre les caspases et des protéines adaptatrices. Le domaine DD retrouvé sur les protéines adaptatrices et les domaines DED et CARD détiennent une conformation de repliement similaire et sont constitués de six hélices α (Solary *et al.*, 1998).

1.4.2 Mécanisme d'activation des caspases

Les pro-caspases doivent être clivées en réponse à un stimulus apoptotique pour devenir catalytiquement actives. La plupart des pro-caspases sont activées par deux clivages protéolytiques à l'extrémité C-terminale. Elles sont clivées en premier lieu entre les sous-unités p20 et p10, puis entre le pro-domaine et la sous-unité p20. L'enzyme mature est un hétérodimère qui s'associe avec un autre hétérodimère par l'interaction de la sous-unité p10 et forme un homodimère d'hétérodimère ou hétérotétramère (Cohen, 1997; Thornberry et Lazebnik, 1998).

Tableau 1 : Principaux substrats des caspases.

(Tiré de Chang et Yang, 2000)

Substrats	Substrats
Protéines de mort cellulaire	Cytosquelette
Bax	Actine
Bcl-2	β-Caténine
Bcl-x _L	Cytokératine-18 et -19
Bid	Fodrine
CrmA	Gas2
FLIP	Gelsoline
IAP	Lamines
p28 Bap31	Plakoglobine
p35	
Pro-caspases	
Régulation du cycle cellulaire	Transduction de signaux
Cdc27	Akt/PkB
Cycline A	Calmoduline-dépendante kinase IV
MDM2	Chaîne TCR-ζ
p21 (Cip1/Waf1)	c-Raf
p27 (Kip1)	D4-GDP
PITSLRE kinases	Fyn tyrosine kinase
Protéine du Rétinoblastome	Kinase d'adhésion focale (FAK)
Wee1 phosphatase	MEKK-1
	MST/Ksr
	PAK-2/hPAK65
	Protéine kinase C δ
	Protéine kinase C ζ
	Protéine kinase C-related kinase 2
	Protéine phosphatase 2A
	Protéine polyose adénomateuse colique (APC)
	Ras-GAP
Métabolisme de l'ADN	Précurseurs des cytokines
Acinus	Pro-IL-1β
Complexe C répliquant l'ADN (DSEB/RFC140)	Pro-IL-16
Facteur de réplication de l'ADN MCM3	Pro-IL-18 (IGIF)
ICAD/DFP45	
NuMA	
PARP	
Protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK)	
Topoisomérase I	
Métabolisme de l'ARN	Protéines des maladies neurodégénératives
Facteur d'initiation 2α des eucaryotes	APP
Protéine 70kDa de U1-snRNP	Ataxine-3 (Ataxie spinocérébelleuse de type 3)
Protéine ribonucléaire hétéronucléaire C1 et C2	Huntington
	Présénilines
	Récepteur androgénique (Protéine dentatorubrale-pallidoluysiane)
Facteurs de transcription	
Facteur de choc thermique	
GATA-1	
IκB-α	
NF-κB (p50, p65)	
NRF-2	
Sp1	
STAT1	
	Autres
	Calpastatine
	Hsp90
	Nedd4
	Phospholipase A2
	Rabaptine-5
	Transglutaminase

Les pro-caspases initiatrices sont les premières recrutées lors de la réception d'un signal apoptotique. Elles sont ensuite clivées, les rendant ainsi actives, puis à leur tour elles recrutent les pro-caspases effectrices et les activent lors de leur clivage. Les caspases initiatrices sont activées par oligomérisation lors de leur recrutement par la voie des récepteurs de mort ou par la voie de la mitochondrie. Le mécanisme par lequel l'oligomérisation active les caspases n'est pas tout à fait clair. Par contre, il a été déterminé que le contrôle de l'oligomérisation des pro-caspases-1 et -8 augmentent leur activité dans l'induction de l'apoptose (Chang et Yang, 2000; Martin *et al.*, 1998). Les caspases effectrices sont quant à elles activées par les caspases initiatrices ou par d'autres protéases. *In vivo*, les caspases effectrices sont activées par la cascade de caspases menée par les voies de signalisation des récepteurs de mort et de la mitochondrie. Les caspase-3 et -7 peuvent également être activées *in vitro* par les caspase-6, -8, -9 et -10 ainsi que par la granzyme B produite par les lymphocytes T cytotoxiques (Chang et Yang, 2000).

1.4.3 Substrats des caspases

Le site catalytique actif des caspases est composé de la cystéine 285 et de l'histidine 237, retrouvées dans la sous-unité p20, ainsi que de la glycine 238 nécessaire à la stabilisation des liaisons d'hydrogène. Les caspases reconnaissent un résidu d'acide aspartique en position P1 de leurs substrats grâce à deux résidus, c'est-à-dire l'arginine 179 et la glutamine 283 de la sous-unité p20. L'arginine 341 et la sérine 347 de la sous-unité p10 sont nécessaires pour la reconnaissance d'un résidu d'acide aspartique en position P4, ainsi que pour leurs spécificités (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999). Les caspases effectrices jouent un rôle important en clivant plusieurs protéines et enzymes qui contribuent aux changements morphologiques de la cellule, dont l'arrêt du cycle cellulaire, la fragmentation de l'ADN et le démantèlement du cytosquelette.

Le rôle premier des caspases est d'inactiver des protéines qui protègent la survie de la cellule. Le tableau I indique les principaux substrats clivés par les caspases. Jusqu'à présent, plus de 60 substrats ont été identifiés. Les caspases clivent des protéines directement impliquées dans le processus de l'apoptose dont certains membres de la

famille de Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L, Bid et Bax), ainsi que le DFF45, la sous-unité inhibitrice du facteur de fragmentation de l'ADN 40 (DFF40). Plusieurs substrats sont des composants impliqués dans la structure du cytosquelette et du noyau, dont l'actine, la gélosine et les lamines. Le clivage de ces protéines est en partie responsable du démantèlement de la cellule. De nombreux substrats sont impliqués dans le métabolisme et la réparation de l'ADN incluant PARP, la sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PKcs) et la protéine RF-C 140 impliquée dans la réparation de l'ADN. Le clivage et l'inactivation des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN induisent des dommages à l'ADN et contribuent à l'induction de l'apoptose. De nombreuses protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire sont également des cibles des caspases dont plus particulièrement de la caspase-3. Par exemple, suite au clivage de la PAK2 et de la MEKK1, ces kinases deviennent actives et à leur tour elles activent la voie de signalisation des JNK. Cette voie de signalisation amplifie l'induction de l'apoptose et l'activation des caspases (Chang et Yang, 2000; Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999).

1.4.4 Régulation de l'activité et du processus des caspases

Étant donné les effets dévastateurs de l'activité des caspases, la production, le processus et l'activité des caspases sont régulés par différents mécanismes. La phosphorylation, entre autres, modifie l'activité des caspases. Par exemple, la phosphorylation de la caspase-9 par la protéine sérine/thréonine kinase Akt inhibe son activité *in vitro* et son activation *in vivo*. La phosphorylation des caspases inhibe leur assemblage tétramérique (Cardone *et al.*, 1998). La famille Bcl-2 régule également l'activité de certaines caspases, principalement la caspase-9. Bcl-2 et Bcl-x_L, entre autres, empêchent la libération du cytochrome c par la mitochondrie et inhibent la formation du complexe Apaf-1/ cytochrome c/ caspase-9 (Huang, Adams et Cory, 1998).

Certains virus possèdent la capacité d'inhiber l'induction de l'apoptose pour prolonger la vie de leur hôte et maximiser leur réplication virale (Chang et Yang, 2000). La famille des IAP, originalement identifiée à partir du baculovirus, joue un rôle

important dans l'inhibition de l'apoptose. Chez les mammifères cinq homologues sont connus : NAIP, cIAP1/HIAP2, cIAP2/HIAP1, hILP/XIAP et survivine. L'effet protecteur des IAP est dû à leurs capacités d'inhiber l'activation et l'activité de certaines caspases. Ainsi, XIAP, cIAP-1 et cIAP-2 peuvent inhiber l'activité des caspases effectrices 3 et 7 et l'activation de la caspase-9 par le cytochrome c (Jaattela, 1999). Les IAP, à l'exception de la survivine, possèdent trois domaines BIR dans leur partie N-terminale et un domaine d'interaction entre protéines composé d'un atome de zinc nommé RING dans leur région C-terminale. Le domaine BIR2 est le principal domaine impliqué dans l'inhibition des caspases (Takahashi *et al.*, 1998). De plus, cIAP-1 et cIAP-2 peuvent se lier aux facteurs associés au TNFR (TRAF-1 et 2) grâce à leurs motifs BIR (Roy *et al.*, 1997). Cela implique que la famille des IAP peut exercer des effets inhibiteurs sur l'activation des caspases en aval des récepteurs de mort. De plus, cIAP-1, cIAP-2 et XIAP ont été décrits comme des inducteurs de l'activation de NF- κ B pouvant contribuer à l'effet protecteur (Wang *et al.*, 1998). La protéine virale cowpox CrmA joue également un rôle d'inhibiteur en ciblant directement le site actif des caspases. Lorsqu'elle est clivée par une caspase, elle reste liée à la caspase et bloque ainsi le site actif de la caspase (Ray *et al.*, 1992). La protéine virale v-FLIP peut aussi inhiber l'apoptose. Elle contient deux DED similaires à ceux composant la région N-terminale de la pro-caspase-8. Lors de l'activation de la voie des récepteurs de mort, il y a compétition entre la pro-caspase-8 et v-FLIP pour le recrutement au niveau du complexe des récepteurs (Hu *et al.*, 1997; Irmeler *et al.*, 1997).

1.5 Les endonucléases : fragmentation de l'ADN génomique

L'apoptose nucléaire est la modification morphologique la plus marquante de l'apoptose. Elle consiste en une condensation périnucléaire de la chromatine menant à une destruction nucléaire massive. La fragmentation internucléosomale de l'ADN est un événement caractéristique de l'étape finale de l'apoptose chez les mammifères (Widlak et Garrard, 2001). Une hypothèse du rôle de la fragmentation de l'ADN est la prévention du transfert de l'ADN potentiellement incorrect à d'autres cellules comme un gène viral (Widlak, 2000). L'ADN peut subir deux types de fragmentation lors de l'apoptose.

Premièrement, un clivage de l'ADN précoce effectué par, entre autres, la topoisomérase II α et le DFF40 qui créent des fragments de haut poids moléculaire de 1 Mpb à 50 kpb détectables par gel d'électrophorèse en champ pulsé (Walker *et al.*, 1999). Le taux de génération de ce type de fragment dépend du type de cellules ainsi que du stimulus apoptotique. Deuxièmement, les fragments de haut poids moléculaire peuvent subir un second clivage générant des fragments de petit poids moléculaire de 180 à 200 pb médiés, entre autres, par les nucléases DFF40, NUC18, endonucléase G et DNase I. Ce type de fragmentation peut être détecté par électrophorèse sur gel d'agarose formant une migration semblable à une échelle (Lecoeur, 2002; Walker *et al.*, 1999).

D'un point de vue fonctionnel, les nucléases peuvent être classées en trois groupes. Le premier groupe comprend les endonucléases dépendantes du Ca²⁺ et du Mg²⁺. L'enzyme la plus connue de ce groupe est la DNase I et son activité optimale est à un pH neutre. D'autres membres font également partie de ce groupe dont la DNase γ active en présence de Ca²⁺ et de Mg²⁺, de Ca²⁺ et de Mn²⁺ ou de Mn²⁺ seul, ainsi que les nucléases NUC18 et NUC70. Le deuxième groupe représente les endonucléases dépendantes du Mg²⁺ dont un seul membre en fait parti, le DFF40. Cette enzyme est activée suite à l'activation de la cascade de caspases. Le dernier groupe comprend les endonucléases indépendantes de cations dont la DNase II et la L-DNase II toutes deux activées en milieu acide (Counis et Torriglia, 2000; Lecoeur, 2002).

1.5.1 Le DFF40 : facteur de fragmentation de l'ADN

Le DFF40 est l'endonucléase principalement responsable de la fragmentation de l'ADN au cours de l'apoptose. Il a été démontré que des thymocytes déficients pour l'expression du DFF40 ne possèdent pas de fragmentation de l'ADN suite à plusieurs stimuli apoptotiques (Kawane *et al.*, 2003). Sous sa forme inactive, le DFF40 est associé à une sous-unité régulatrice de 45 kDa (DFF45) (Widlak, 2000). Cette association forme un hétérodimère où les protéines Hsc70 et Hsp40 participent à l'assemblage fonctionnel (Sakahira et Nagata, 2002). Le complexe DFF45/DFF40 retrouvé chez l'humain est l'équivalent du complexe ICAD-L/CAD retrouvé chez la souris et comporte 75 % de

similitudes structurales. Le DFF45 est composé de 331 acides aminés tandis que le DFF40 est composé de 345 acides aminés et ils possèdent tous les deux une séquence de localisation nucléaire dans leur région C-terminale (Gu *et al.*, 1999; Scholz *et al.*, 2002). Par épissage alternatif, le DFF45 possède un isoforme court de 35 kDa (DFF35/ICAD-S) (Masuoka *et al.*, 2001). Le DFF35 est composé de 268 acides aminés et ne possède pas de séquence de localisation nucléaire (Widlak *et al.*, 2003).

En plus d'un signal de localisation nucléaire, la région C-terminale du DFF40 détient un domaine catalytique. En effet, la délétion des acides aminés 290 à 345 inhibe l'activité enzymatique du DFF40 (Inohara *et al.*, 1999). Le complexe DFF45/DFF40 est médié par la liaison de trois domaines du DFF45 et de deux domaines du DFF40 (McCarty, Toh et Li, 1999). Le DFF45 se lie au DFF40 via les acides aminés en position 101 à 180 (Chen *et al.*, 2000). Le DFF45 et le DFF40 possèdent une région conservée d'acides aminés en position 23 à 100 nécessaire pour l'inhibition de l'activité nucléase du DFF40 (Gu *et al.*, 1999). En plus de son rôle d'inhibition sur l'activité du DFF40, le DFF45 est une molécule chaperonne nécessaire pour le repliement et la conformation adéquate du DFF40 (Figure 2A). En effet, des souris exprimant le DFF40, mais déficientes pour l'expression du DFF45, démontrent une absence de la condensation de la chromatine et de la fragmentation de l'ADN (Zhang *et al.*, 1998). Le DFF35 ne possède pas la fonction de molécule chaperonne, mais seulement la fonction d'inhibition puisqu'il ne possède pas les 63 acides aminés de la région C-terminale du DFF45. Le DFF35 lie le DFF40 plus fortement que le DFF45 agissant comme un inhibiteur additionnel du DFF40 augmentant ainsi le contrôle effectué par le DFF45 (Gu *et al.*, 1999).

Suite à l'activation de la caspase-3, le DFF45 est clivé aux acides aminés 117 et 224, formant trois fragments de 10 à 15 kDa (McCarty, Toh et Li, 1999). Le DFF45 peut également être clivé par la caspase-7 et la granzyme B (Thomas *et al.*, 2000) mais avec une plus faible affinité. Le DFF40 est ainsi libéré et forme des homo-oligomères représentant sa forme active. Dans le noyau, l'activité nucléase du DFF40 est par la suite stimulée par des protéines chromosomales spécifiques dont l'histone H1, HMG-1, HMG-2 et la topoisomérase II (Liu *et al.*, 1999; Toh, Wang et Li, 1998). L'activité du DFF40

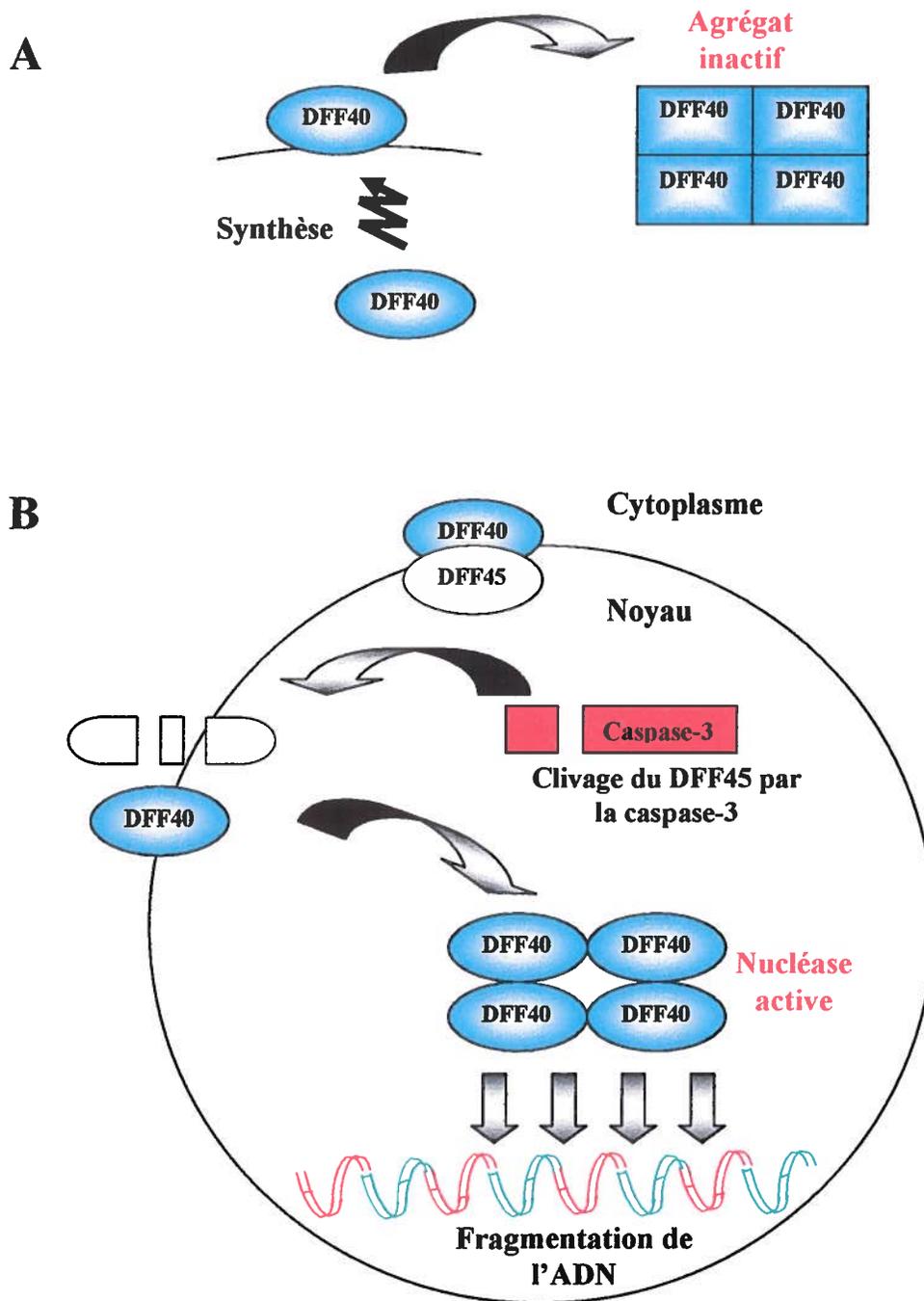


Figure 2 : Mécanisme proposé de l'activation du DFF40 A- La synthèse du DFF40 lors de l'absence du DFF45 forme un agrégat inactif B- La présence du DFF45 permet une conformation optimale du DFF40, puis sa translocation vers le noyau suite au clivage du DFF45 par la caspase-3.

(Modifié de Widlak, 2000)

est affectée par la concentration ionique de la cellule. En effet, son activité est optimale à une concentration intracellulaire de K^+ allant de 50 à 125 mM, une concentration représentative de cellules en apoptose. Son activité est optimale à un pH allant de 7.0 à 8.5. Le DFF40 est également actif lors d'une acidification intracellulaire reliée à l'induction de l'apoptose (Widlak et Garrard, 2001).

La localisation du complexe DFF45/DFF40 est controversée. Il a premièrement été déterminé, chez des lymphocytes, que le clivage du DFF45 se produit dans le cytosol puis le DFF40 est transloqué dans le noyau (Mitamura *et al.*, 1998; Sakahira, Enari et Nagata, 1998). Ce mécanisme proposé est représenté à la figure 2B. Le complexe DFF45/DFF40 a par la suite été retrouvé dans le noyau de plusieurs types cellulaires (Liu *et al.*, 1997; Samejima et Earnshaw, 1998; Samejima, Tone et Earnshaw, 2001). Cependant, les études démontrant la localisation du complexe au niveau nucléaire portent sur l'expression exogène du complexe. La démonstration de la localisation du complexe endogène reste à être effectuée. En faisant abstraction des différences entre les méthodologies utilisées, la localisation du complexe pourrait varier selon le type de cellules (Samejima et Earnshaw, 2000).

1.6 Phagocytose des cellules apoptotiques

L'élimination par les phagocytes des cellules apoptotiques est l'étape finale et l'objectif principal du processus de l'apoptose. L'élimination rapide et efficace des cellules apoptotiques est essentielle pour la prévention de la nécrose secondaire. Un défaut dans la phagocytose des cellules apoptotiques peut conduire à l'induction d'inflammation et d'auto-immunité (Ravichandran, 2003). Des modifications à la surface des cellules apoptotiques interviennent dans la reconnaissance des cellules par les phagocytes. Le marqueur le plus connu est l'externalisation des résidus phosphatidylsérine (PS) à la surface de la membrane plasmique qui se produit conjointement avec l'acidification intracellulaire reliée à l'apoptose (Meisenholder *et al.*, 1996). Les PS sont normalement retenus au feuillet interne de la membrane plasmique. L'externalisation des PS est régulée par plusieurs activités enzymatiques dont

l'aminophospholipide translocase responsable de la distribution asymétrique des PS en faveur du feuillet interne et la scramblase responsable de l'homogénéisation de la distribution des phospholipides entre les feuillets membranaires (Fadok et Chimini, 2001). L'asymétrie phospholipide perdue mène à l'apparition des PS sur le feuillet externe détectée par coloration à l'annexine V. Plusieurs récepteurs des phagocytes peuvent reconnaître les PS dont le récepteur de PS (PSR), le CD14, le CD36 et la protéine reliée au récepteur des LDL (LRP1) (Krieser et White, 2002). Un autre changement à la surface des cellules apoptotiques est l'altération des hydrates de carbone membranaires. Cette altération a originalement été identifiée par la reconnaissance de récepteurs à la surface des phagocytes constitués de lectines qui identifient les changements en hydrates de carbone sur la surface des cellules apoptotiques. L'altération en hydrates de carbone a également été identifiée par une perturbation des charges électriques observée à la surface des cellules en apoptose. Les changements au niveau lipidique de la membrane pourraient provoquer la redistribution des glycoprotéines et engendrer de nouveaux déterminants glucidiques (Fadok et Chimini, 2001; Henson, Bratton et Fadok, 2001).

CHAPITRE 2

LE CD45 : IMPLICATION DANS L' APOPTOSE DES CELLULES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

2.1 Structure et différents isoformes du CD45

Le CD45 est une protéine tyrosine phosphatase transmembranaire de type I retrouvée chez les cellules hématopoïétiques nucléées et leurs précurseurs. Le CD45 est la glycoprotéine la plus abondante chez les cellules lymphoïdes représentant jusqu'à 10 % de toutes les molécules de surface. Le CD45 peut représenter jusqu'à 90 % de l'activité tyrosine phosphatase transmembranaire (Trowbridge et Thomas, 1994). Il est constitué d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une région cytoplasmique. La région cytoplasmique est composée de deux domaines PTPase (Protéine Tyrosine Phosphatase) (D1 et D2) où seulement D1 est requis pour l'activité enzymatique. Ces domaines sont composés de 240 acides aminés et séparés par une région de 56 acides aminés (Trowbridge et Thomas, 1994). La région extracellulaire est fortement N-glycosylée et contient une région riche en cystéine suivie de trois domaines fibronectine de type III (Symons, Willis et Barclay, 1999). Le CD45 est exprimé sous plusieurs isoformes par épissage alternatif de trois exons conduisant pour la séquence près de la région extracellulaire N-terminale. L'utilisation variable des exons 4, 5 et 6 désignés A, B, et C, génère 8 isoformes (Penninger *et al.*, 2001). L'isoforme le plus gros est RABC qui inclut les trois exons et l'isoforme le plus petit est RO qui exclut les trois exons (Figure 3). Le poids de ces isoformes varie de 180 à 220 kDa dépendamment du niveau de la glycosylation du domaine extracellulaire. En effet, le tiers du poids moléculaire du CD45 mature est constitué d'hydrates de carbone variant quantitativement et qualitativement dépendamment du type de cellules et de l'isoforme exprimé (Arendt et Ostergaard, 1997). L'expression des différents isoformes du CD45 est régulée lors du développement embryonnaire et selon le type de cellules. Par exemple, les cellules T naïves expriment principalement l'isoforme CD45RA tandis qu'après leur activation elles expriment plutôt l'isoforme CD45RO (Majeti *et al.*, 2000).

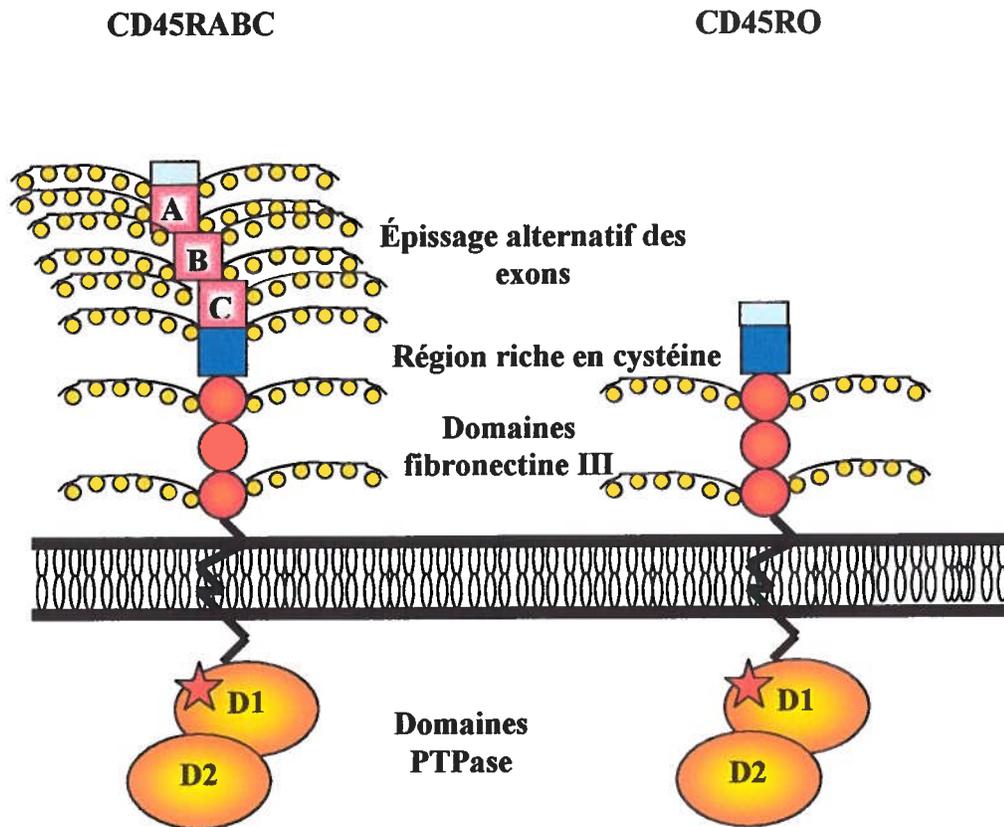


Figure 3 : Différences structurales par épissage alternatif de deux isoformes du CD45 : CD45RABC et CD45RO.

(Tiré de Penninger *et al.*, 2001)

2.2 Membres de la famille Src impliqués dans l'activation des lymphocytes T

Les lymphocytes T jouent un rôle important dans la réponse immunitaire adaptative. L'activation des lymphocytes T, médiée par une cascade d'événements, mène à la

prolifération et à la différenciation des cellules. Cette activation est initiée par l'engagement du récepteur des cellules T (TCR) lors de la reconnaissance de peptides d'antigènes étrangers liés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou II retrouvé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Le TCR est un hétérodimère polymorphique composé de deux glycoprotéines transmembranaires, les chaînes α et β , impliquées dans la reconnaissance de l'antigène. Le TCR est associé aux protéines invariantes du complexe, CD3 γ , δ , ϵ et ζ , requises pour l'expression du récepteur de surface et la transduction de signaux. L'engagement du TCR mène à une série d'événements biochimiques incluant la phosphorylation de protéines, le clivage de phospholipides, des changements dans la concentration intracellulaire des ions et le réarrangement du cytosquelette (Kiefer, Vogel et Arnold, 2002 ; Van Leeuwen et Samelson, 1999).

L'engagement du TCR permet le recrutement, par des motifs d'activation de tyrosine du récepteur immunologique (ITAM) situés sur le complexe CD3, de deux protéines tyrosines kinases de la famille Src, la $p56^{lck}$ et la $p59^{fyn}$ (Thomas et Brugge, 1997). Ces kinases phosphorylent les ITAM permettant les liaisons avec des protéines contenant des domaines SH2. Ces liaisons permettent la formation d'un complexe multiprotéinique intracellulaire incluant différentes enzymes et protéines adaptatrices responsables du déclenchement des voies intracellulaires de signalisation menant à l'activation des lymphocytes T (Billadeau et Leibson, 2002). Ces deux membres de la famille Src sont les principaux substrats du CD45 et sont responsables de l'initiation d'une réponse immunitaire chez les lymphocytes T et B. La protéine $p56^{lck}$ est principalement exprimée chez les lymphocytes T, mais elle est également exprimée chez les cellules NK (« Natural Killer ») ainsi que dans le cerveau (Lefebvre *et al.*, 2003; Thomas et Brugge, 1997). Par épissage alternatif, la protéine $p59^{fyn}$ est exprimée sous deux isoformes. Chez les lymphocytes T, l'utilisation de l'exon 7B produit la protéine Fyn (T) tandis que, dans le cerveau et dans d'autres tissus, l'utilisation de l'exon 7A forme la protéine Fyn (B) (Resh, 1998).

La famille Src comprend neuf membres jusqu'à ce jour, exprimés ubiquitairement (Src, Fyn, Yes) ou selon le type de cellules (Fgr, Lyn, Hck, Lck, Blk, Yrc) (Arold *et al.*, 2001; Luciano, Ricci et Auberger, 2001). Chez les vertébrés, les membres de Src possèdent une masse moléculaire entre 52 à 62 kDa et comprennent six domaines fonctionnels : un domaine d'homologie à Src 4 (SH4) qui contient des signaux de régulation pour la modification des acides gras, un domaine unique spécifique pour chaque membre, un domaine SH3 qui reconnaît les motifs riches en proline, un domaine SH2 qui reconnaît les phosphotyrosines, un domaine SH1 qui constitue le domaine catalytique kinase et une queue régulatrice C-terminale (Tatosyan et Mizenina, 2000; Thomas et Brugge, 1997). Les membres de la famille Src sont, entre autres, impliqués dans la modulation des signaux provenant de facteurs de croissance, de cytokines et des récepteurs des intégrines (Hermiston, Xu et Weiss, 2003).

2.3 Importance du CD45 dans l'activation des lymphocytes T

La régulation de la phosphorylation des résidus tyrosine induite par une stimulation antigénique est médiée par des activités réciproques des protéines tyrosines kinases et des protéines tyrosines phosphatases. Le CD45 est une protéine tyrosine phosphatase essentielle pour la transduction des signaux menée par la stimulation antigénique chez les lymphocytes B et T. La nécessité du CD45 a été démontrée par plusieurs études. Des lignées cellulaires de lymphocytes T et B déficients pour l'expression du CD45 sont incapables de répondre à une stimulation antigénique du récepteur (Justement *et al.*, 1991; Weaver *et al.*, 1991). Des souris déficientes pour l'expression du CD45 démontrent un important blocage dans le développement et le fonctionnement des lymphocytes T et B (Byth *et al.*, 1996). Chez ces souris, il y a un blocage de la maturation des thymocytes au stade double négatif dû à une augmentation de l'apoptose basale. De plus, la différenciation des thymocytes $CD4^+CD8^+$ en thymocytes $CD4^+CD8^-/CD4^-CD8^+$ et l'élimination des thymocytes auto-réactifs sont également compromises. Ces défauts du développement des lymphocytes T mènent à une lymphopénie et une anergie des lymphocytes T (Byth *et al.*, 1996; Lesage *et al.*, 1997). Ces lymphocytes T déficients pour l'expression du CD45 possèdent des déficiences

dans la phosphorylation sur les résidus tyrosine suite à une stimulation du TCR, dans le métabolisme phosphoinositide, dans l'activation de la protéine kinase C, dans la mobilisation du calcium, dans la production de l'IL-2 ainsi que dans l'induction de la phosphorylation sur les résidus tyrosine par des anticorps spécifiques au récepteur CD4 (Thomas et Brugge, 1997). De plus, des patients déficients pour l'expression du CD45 manifestent une immunodéficience combinée sévère (SCID), un phénotype similaire observé chez les souris déficientes pour l'expression du CD45 (Cale *et al.*, 1997; Majeti *et al.*, 2000). Le CD45 joue donc un rôle important pour l'amplification de la signalisation du TCR.

2.3.1 Régulation de la famille Src par le CD45

La nécessité du CD45 dans l'activation des lymphocytes est due à sa régulation de la p56^{lck} et de la p59^{fyn}, impliquées au tout début de la signalisation intracellulaire. La modulation de l'activité de ces deux membres de la famille Src représente un facteur important puisqu'ils sont situés à proximité du site de transduction du TCR et qu'ils sont rapidement activés suite à une liaison du TCR (Thomas et Brugge, 1997). L'activité de ces deux protéines est contrôlée par deux résidus tyrosine, c'est-à-dire, deux sites majeurs de phosphorylation : une région tyrosine en C-terminale pour la régulation négative de l'activité kinase et une région d'autophosphorylation située dans le domaine kinase (Irles *et al.*, 2003). Leur activité est régulée par l'action opposée du CD45 et de la kinase Src C-terminale nommée Csk (Figure 4) (Hermiston, Xu et Weiss, 2003). La phosphorylation de la tyrosine C-terminale, en position 505 chez Lck, par Csk mène à une interaction intramoléculaire avec le domaine SH2 qui inhibe l'activité de Lck par une *trans*-autophosphorylation de la tyrosine, en position 394 chez Lck, dans son domaine catalytique (Rao *et al.*, 2002). La phosphorylation de la tyrosine en C-terminale induit le repliement de la molécule sur elle-même. Cette conformation inactive est stabilisée par une interaction intramoléculaire entre le domaine SH3 et des acides aminés riches en proline situés dans le domaine SH2 (Lefebvre *et al.*, 2003). La déphosphorylation de la tyrosine régulatrice par le CD45 enlève l'inhibition et augmente l'activité de la kinase (Alexander, 2000). L'activité des membres de Src est régulée par la balance entre Csk et

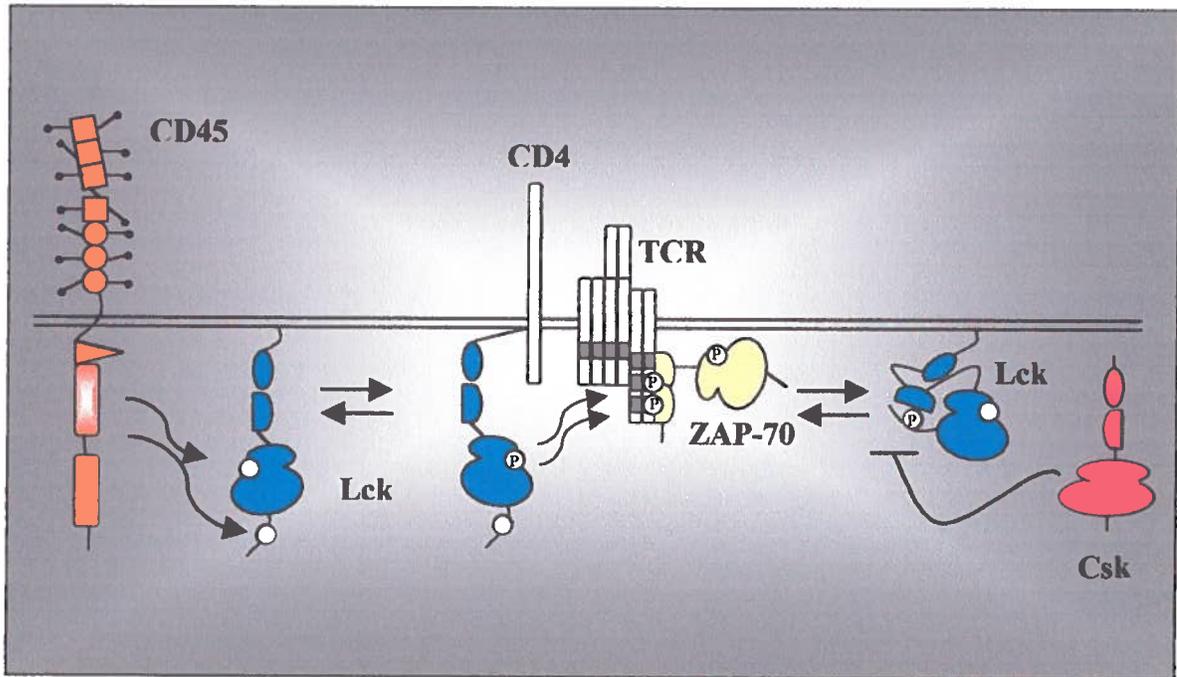


Figure 4 : Régulation réciproque de la protéine tyrosine kinase p56^{lck} par le CD45 et Csk. Le CD45 peut déphosphoryler la région d'autophosphorylation située dans le domaine kinase et la région tyrosine en C-terminale de la p56^{lck} où cette dernière région est favorisée. La kinase active peut phosphoryler les ITAM du CD3 et des chaînes ζ permettant la phosphorylation de ZAP-70 et la propagation d'événements de signalisations intracellulaires. La protéine tyrosine kinase p56^{lck} peut être inactivée par la phosphorylation de sa tyrosine en C-terminale médiée par Csk.

(Tiré de Hermiston, Xu et Weiss, 2003)

CD45 et un changement dans la localisation de Csk et/ou CD45 peut affecter la signalisation induite par le TCR. En effet, lors de liaison du TCR l'augmentation de la phosphorylation de la tyrosine dans le domaine kinase est la conséquence entre autres du relâchement de Csk par les membranes enrichies de glycosphingolipides (GEM) (Irles *et al.*, 2003). Dans les cellules au repos, Csk est associé aux GEM via l'interaction des domaines SH2 et est lié à un adaptateur transmembranaire, une protéine liant Csk (Cbp) tandis qu'après l'engagement du TCR, Csk est libéré de Cbp (Kiefer, Vogel et Arnold, 2002).

L'expression de Lck avec une mutation de la tyrosine C-terminale 505 (LckF505) peut rétablir le développement des lymphocytes T chez des souris déficientes pour

l'expression du CD45 (Seavitt *et al.*, 1999). Ce rétablissement démontre la fonction majeure du CD45 dans le développement des lymphocytes T en déphosphorylant la tyrosine en position C-terminale. En plus de son rôle positif, le CD45 a également un effet négatif par son habileté à déphosphoryler la tyrosine dans le domaine kinase (Thomas et Brown, 1999). En effet, les lymphocytes exprimant la forme LckF505 démontrent une Lck plus active et une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine 394 dans le domaine kinase (Seavitt *et al.*, 1999). Le CD45 joue donc également un rôle dans la déphosphorylation de la tyrosine du domaine kinase et peut réguler négativement l'activité de Lck (Penninger *et al.*, 2001).

2.3.2 Autres substrats du CD45

Le rôle principalement connu du CD45 est d'activer les protéines tyrosines kinases de la famille Src en déphosphorylant leurs résidus tyrosine inhibiteurs. Selon la situation, les actions du CD45 peuvent avoir plutôt des effets inhibiteurs que stimulateurs sur la signalisation induite par l'engagement du TCR. Par exemple, le CD45 peut interagir et déphosphoryler les tyrosines sur la chaîne zêta du TCR (Frearson et Alexander, 1996). Puisque la phosphorylation de tyrosines sur les chaînes zêta du TCR recrute les protéines tyrosines kinases de la famille Syk pour l'amplification du signal, la déphosphorylation des chaînes zêta du TCR par le CD45 diminue la stimulation du signal. De plus, il a été suggéré que le CD45 inactive directement ou indirectement ZAP-70 en déphosphorylant les résidus tyrosine (Mustelin *et al.*, 1995).

2.4 Régulation de l'activité du CD45

La dimérisation du CD45 a été proposée comme modèle de régulation de l'activité du CD45. Il a été proposé que le CD45 fonctionne en étant un monomère tandis que son homodimérisation inhibe la transduction de signaux (Majeti *et al.*, 1998). Cette inhibition est causée par la dimérisation des domaines phosphatases où l'activité phosphatase est

bloquée par des contacts avec une portion structurale de la région membranaire du CD45 juxtaposée (Penninger *et al.*, 2001). Il a été démontré que la dimérisation du CD45 peut être régulée par sa région extracellulaire (Xu et Weiss, 2002). En effet, l'homodimérisation du CD45 varie selon l'isoforme du CD45 exprimé. Le plus petit isoforme, RO, dimérise plus rapidement et plus efficacement que RABC, le plus large isoforme. En fait, des études mécanistiques ont démontré que la dimérisation du CD45 est affectée par la glycosylation des exons épissés alternativement. De plus, l'expression de l'isoforme RABC rétablit plus efficacement la signalisation cellulaire chez des lymphocytes T déficients pour l'expression du CD45 que l'isoforme RO (Xu et Weiss, 2002). Plusieurs jours suivants une stimulation du TCR, les lymphocytes T activés changent l'expression de l'isoforme RA pour l'isoforme RO (Hall *et al.*, 1999). Ce mécanisme serait utile pour diminuer l'activité phosphatase du CD45 et contribuer à l'arrêt d'une réponse immunitaire (Hermiston, Xu et Weiss, 2003).

Dans certains types de cellules, le CD45 peut également inhiber la protéine p56^{lck} en déphosphorylant son résidu tyrosine situé dans son domaine kinase (Takeda, Wu et Maizel, 1992). La régulation des activités opposées du CD45 demeure toujours inconnue. Par contre, sa liaison avec une protéine associée au CD45 (CD45-AP) modifie son interaction avec certaines protéines. La protéine CD45-AP est fortement exprimée chez les lymphocytes B et T et joue un rôle d'adaptateur en coordonnant les interactions entre le CD45 et certaines protéines tyrosines kinases dont ZAP-70 et p56^{lck} (Motoya *et al.*, 1999). De plus, l'association du CD45 avec l'enzyme glucosidase II contenant des chaînes catalytiques α et β a été déterminée comme pouvant être un nouveau mécanisme de régulation du CD45. En effet, cette association pourrait jouer un rôle important dans la fonction immunitaire en régulant, entre autres, la glycosylation du CD45 (Baldwin, Gogela-Spehar et Ostergaard, 2000).

2.5 Implication du CD45 dans l'apoptose des lymphocytes T

Le CD45 est impliqué dans la régulation de la signalisation cellulaire menant à la survie des lymphocytes. Le CD45 est connu pour sa régulation positive sur la

prolifération et la différenciation des thymocytes. Par exemple, des thymocytes déficients pour l'expression du CD45 démontrent une réduction dans la transition des thymocytes $CD4^-CD8^-$ à $CD4^+CD8^+$ et une réduction encore plus marquée dans la maturation des thymocytes $CD4^+CD8^+$ à des thymocytes $CD4^+$ et $CD8^+$ (Baker *et al.*, 2000; Frearson et Alexander, 1996). L'implication du CD45 dans la signalisation cellulaire de la mort par apoptose reste encore nébuleuse. Toutefois, quelques études décrites plus bas ont démontré un rôle probable du CD45 dans l'apoptose.

2.5.1 Liaison du CD45 par des anticorps monoclonaux

Il a été déterminé que la liaison du CD45 par des anticorps monoclonaux induit l'apoptose chez les lymphocytes T et B (Klaus, Sidorenko et Clark, 1996). L'apoptose induite par la liaison du CD45 chez ces cellules est caractérisée par des signes morphologiques caractéristiques à l'apoptose comme la formation de corps apoptotiques et la condensation de la chromatine. Par contre, la fragmentation de l'ADN caractéristique à la plupart des stimuli apoptotiques est absente. Cette absence de fragmentation peut être causée par la dimérisation des domaines phosphatases qui peut-être régulée par la région extracellulaire du CD45 (Xu et Weiss, 2002). Chez les lymphocytes T, l'apoptose induite par la liaison du CD45 est grandement augmentée suite à une liaison du CD3 par des anticorps monoclonaux. L'apoptose est bloquée par l'ajout d'inhibiteurs de protéines tyrosines kinases et de protéines tyrosines phosphatases. Par contre, l'ajout d'inhibiteurs de la synthèse d'ARN et de protéines ne permet pas l'inhibition de cette mort par apoptose (Klaus, Sidorenko et Clark, 1996).

Une autre étude a démontré l'induction de l'apoptose par la liaison du CD45 chez des thymocytes (Lesage *et al.*, 1997). La liaison du CD45 par des anticorps monoclonaux de ces thymocytes mène à l'apoptose caractérisée par la réduction du potentiel mitochondrial, la production de réactifs oxygénés, la perte de l'asymétrie membranaire et l'exposition des résidus phosphatidylsérine. Similairement à l'étude effectuée par Klaus, Sidorenko et Clark (1996), l'induction de la mort n'a pas mené à une fragmentation de

l'ADN. De plus, la mort cellulaire induite par la liaison du CD45 n'est pas inhibée par une surexpression du gène Bcl-2 ou par un inhibiteur des caspases. La sensibilité des thymocytes à l'apoptose par la liaison du CD45 est augmentée lors de la transition des thymocytes $CD4^-CD8^-TCR^-$ en thymocytes $CD4^+CD8^+TCR^-$. De plus, la sensibilité est augmentée lors de l'acquisition du TCR à la surface de la cellule. Enfin, les thymocytes matures sont moins sensibles à la liaison du CD45 que les thymocytes $CD4^+CD8^+$. Les auteurs ont proposé que durant le développement des cellules T, la liaison du CD45 pourrait induire la mort par apoptose des thymocytes immatures ne possédant pas les critères requis pour la sélection positive (Lesage *et al.*, 1997).

La cascade d'événements reliée à l'induction de l'apoptose par la liaison du CD45 reste à être découverte. Par contre, il a été déterminé que le domaine cytoplasmique et l'activité phosphatase du CD45 ne sont pas nécessaires dans l'induction de l'apoptose par la liaison du CD45 (Fortin *et al.*, 2002). En effet, des lignées cellulaires de thymocytes déficients pour l'activité phosphatase ou pour la région cytoplasmique du CD45 sont susceptibles à l'induction de l'apoptose par la liaison du CD45 par des anticorps monoclonaux. Ces résultats suggèrent un rôle possible pour le domaine extracellulaire et le domaine transmembranaire du CD45 dans la signalisation de l'apoptose (Fortin *et al.*, 2002).

2.5.2 Liaison du CD45 par son ligand naturel, la galectine-1

La galectine-1 est une lectine homodimérique de 14 kDa membre de la famille des lectines démontrant des similitudes structurales au niveau du domaine de liaison d'hydrates de carbone (Perillo *et al.*, 1997). La galectine-1 est exprimée chez une variété de types cellulaires incluant les cellules épithéliales thymiques, les cellules endothéliales, les cellules dendritiques, les macrophages et les fibroblastes (He et Baum, 2003). Cette lectine sécrétée et soluble reste associée à la surface des cellules ou à la matrice extracellulaire en se liant à différentes glycoprotéines (Symons, Cooper et Barclay,

2000). Elle peut être liée par plusieurs glycoprotéines dont les fibronectines, les protéines membranaires associées aux lysosomes, le CD7, le CD43 et le CD45. Cette lectine soluble induit la mort cellulaire des thymocytes et des lymphocytes T activés par, entre autres, l'intermédiaire du récepteur de mort Fas, de stéroïdes et de la voie de signalisation indépendante du CD3 (Nguyen *et al.*, 2001).

La galectine-1 est le ligand naturel du CD45 et possède une haute affinité de liaison (Perillo *et al.*, 1995). La galectine-1 joue un rôle possible dans la régulation de l'apoptose des lymphocytes T activés par une interaction avec le CD45. Toutefois, l'induction de l'apoptose par la liaison de la galectine-1 au CD45 est controversée. La liaison de la galectine-1 chez des lymphocytes T activés induit l'apoptose (Perillo *et al.*, 1997). Chez des cellules T Jurkat, la galectine-1 stimule l'expression de résidus phosphatidylsérine à la surface des cellules un indicateur précoce de l'apoptose. Chez ces cellules T Jurkat CD45+, la galectine-1 induit des niveaux plus élevés de résidus phosphatidylsérine en comparaison aux cellules T Jurkat CD45- (Walzel *et al.*, 1999). Ces observations indiquent que le CD45 est impliqué dans l'induction de l'apoptose par la galectine-1. De plus, la galectine-1 induit l'apoptose de thymocytes humains plus particulièrement chez les thymocytes CD4^{faible}CD8^{faible} (Perillo *et al.*, 1997). La galectine-1 pourrait donc être impliquée dans le processus de maturation des thymocytes (Lesage *et al.*, 1997; Perillo *et al.*, 1997). Tandis que l'expression du CD45 est considérée nécessaire pour l'induction de l'apoptose par la galectine-1, il est également suggéré que le CD45 n'est pas le récepteur par lequel la galectine-1 régule l'apoptose (Fajka-Boja *et al.*, 2002). En effet, la galectine-1 peut facilement se lier à la surface cellulaire de lymphocytes T déficients pour l'expression du CD45. De plus, l'induction de l'apoptose par la galectine-1 est similaire chez les lymphocytes normaux et chez les lymphocytes déficients pour l'expression du CD45 (Fajka-Boja *et al.*, 2002). Conséquemment, le mécanisme de régulation de l'apoptose par la galectine-1 reste également à éclaircir. La controverse sur l'induction de l'apoptose par la liaison de la galectine-1 au CD45 peut être expliquée par la liaison de la galectine-1 à d'autres molécules de surface. En effet, la galectine-1 peut aussi se lier au CD2, CD3, CD4, CD7

et CD43. Par contre, seulement le récepteur CD45, CD7 et CD43 semblent participer à l'apoptose médiée par la galectine-1 (Pace *et al.*, 1999; Perillo *et al.*, 1997). La participation du CD43 et du CD7 pourraient expliquer la présence d'une fragmentation de l'ADN contrairement à l'induction de l'apoptose par la liaison du CD45 à l'aide d'anticorps monoclonaux.

2.5.3 Implication du CD45 dans l'apoptose médiée par Fas

Il a été démontré que l'activation de protéines tyrosines kinases est impliquée dans la signalisation apoptotique médiée par le récepteur Fas (Eischen, Dick et Leibson, 1994). La p56^{lck} et la p59^{fyn} sont les deux principales protéines tyrosines kinases impliquées dans la signalisation intracellulaire suite à l'engagement et ces protéines sont régulées par le CD45 (Thomas et Brugge, 1997). Conséquemment, l'implication de ces protéines a été évaluée lors de l'induction de l'apoptose médiée par Fas (Latinis et Koretzky, 1996; Schraven et Peter, 1995). Des cellules T Jurkat normales, des cellules T Jurkat déficientes pour l'expression du CD45 et des cellules T Jurkat déficientes pour l'expression de la p56^{lck} ont été comparées suite à l'induction de l'apoptose par l'intermédiaire de Fas. Chez les trois lignées cellulaires aucune différence significative n'a été observée (Latinis et Koretzky, 1996; Schraven et Peter, 1995). Ces résultats démontrent que la signalisation médiée par Fas ne requière pas l'activité de la p56^{lck} et du CD45. Toutefois, la lignée cellulaire déficiente pour l'expression du CD45 est la lignée de lymphocytes T Jurkat, clone J45.01, qui possède un niveau d'expression basale du CD45 correspondant à 2-3 % de l'expression normale du CD45 (Desharnais, 2001). D'autres études devraient donc être complétées avec une lignée cellulaire complètement déficiente pour l'expression du CD45.

Une étude a démontré que des lymphocytes T activés exprimant un isoforme du CD45 (B220) normalement retrouvé chez les lymphocytes B, meurent facilement par apoptose (Blesing *et al.*, 2001). Les lymphocytes T activés subissent des changements durant leur transition en des lymphoblastes dont, entre autres, une phase d'anergie

menant à l'apoptose. Par exemple, des cellules T activées lymphoblastes de souris expriment à leur surface le marqueur B220 l'isoforme spécifique du CD45R chez les cellules B. Ce marqueur est présent chez les cellules T humaines ainsi que murines et présente un défaut dans la signalisation de l'apoptose médiée par Fas *in vivo*. Ce défaut d'activation suggère un rôle possible pour le marqueur B220 dans la régulation de la transition de l'activation à l'apoptose. Des cellules T humaines activées *in vitro* par des mitogènes expriment également le marqueur B220 lorsqu'elles subissent la blastogenèse et la progression du cycle cellulaire. L'expression de B220 devient à son maximum lorsque les cellules meurent par apoptose. L'implication de l'expression de cet isoforme dans l'induction de l'apoptose reste à être déterminée (Alexander, 2000; Bleesing *et al.*, 2001).

Une autre étude a reporté l'implication du CD45 chez des souris homozygotes Fas^{gld/gld} où leur mutation ne leur permet pas de lancer l'apoptose par l'intermédiaire de la voie de Fas/Fas^l (Brooks et Lynes, 2001). Ces souris développent une maladie auto-immune caractérisée par l'accumulation de cellules T CD4⁻CD8⁻ et une anergie progressive des cellules T. Ces souris anormales présentent un syndrome similaire au lupus érythémateux systémique chez l'humain caractérisé par des anticorps anti-ADN, une hypergammaglobulinémie, une splénomégalie et une sévère lymphadénopathie (Cohen et Eisenberg, 1991). Les cellules de ces souris expriment à leur surface le marqueur B220 un isoforme du CD45. Des souris Fas^{gld/gld} possédant seulement un allèle CD45 fonctionnel (CD45^{+/-}) ont été produites afin d'explorer le rôle du CD45 dans l'accumulation des lymphocytes et la capacité proliférative des cellules T. Ces souris démontrent une réduction de 10 fois de la population de cellules T et détiennent une réduction des niveaux des anticorps anti-ADN et du sérum total d'immunoglobulines. Ces données indiquent que le CD45 est essentiel à l'accumulation des cellules T chez les souris Fas^{gld/gld} et que le CD45 est impliqué dans le processus de la suppression des cellules qui régit normalement la composition de la population de cellules T (Brooks et Lynes, 2001).

2.5.4 Implication du CD45 dans l'apoptose induite par des agents chimiques

Récemment, il a été déterminé que le CD45 possède un rôle dans l'induction de l'apoptose suite à une perturbation de la mitochondrie par agents chimiques dont, entre autres, le tributylétain (TBT) (Desharnais, 2001). Le TBT est un agent biocide utilisé dans les peintures antifoulantes et provoque des effets immunotoxiques chez les mammifères. Les effets du TBT sont caractérisés *in vivo* par une atrophie du thymus et une réduction des lymphocytes périphériques par un mécanisme antiprolifératif et par l'induction de la mort par apoptose (Gennari *et al.*, 1997; Raffray et Cohen, 1993; Raffray et Cohen, 1998). *In vitro*, le TBT induit l'apoptose par la voie de la mitochondrie chez plusieurs lignées cellulaires promyéloïdes et lymphoïdes (Stridh *et al.*, 1998; Stridh, Orrenius et Hampton, 1999; Thompson *et al.*, 1996). Il a été démontré que le CD45 est impliqué dans la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN suite à l'induction de l'apoptose par le TBT (Desharnais, 2001). Contrairement aux lignées cellulaires normales (CD45+), les lignées cellulaires déficientes pour l'expression du CD45 (CD45-) exposées au TBT démontrent une absence de l'apoptose nucléaire. Autant chez les lignées cellulaires CD45+ et CD45-, l'exposition au TBT induit une mobilisation du calcium intracellulaire, la dégradation d'I κ B- α , une dissipation du potentiel mitochondrial, le relâchement du cytochrome c, l'activation de la caspase-3 et le clivage du DFF45 (Desharnais, 2001). Ces résultats démontrent pour la première fois une implication du CD45 dans l'apoptose nucléaire par la voie de la mitochondrie. Le lien entre l'expression du CD45 et l'apoptose nucléaire peut se faire par l'intermédiaire de l'activation de tyrosines kinases dû à la régulation des membres de la famille Src par le CD45.

CHAPITRE 3

LES CANAUX DE CHLORE : RESPONSABLE DE L'HOMÉOSTASIE IONIQUE

3.1 Les principaux canaux de chlore et leurs propriétés

Les canaux à anion sont des pores bordés de protéines retrouvés dans les membranes biologiques qui laissent passer par diffusion passive des ions de charges négatives selon leurs gradients électrochimiques. Ces canaux permettent le passage de plusieurs anions, mais sont dénommés canaux de chlore puisque le chlore est l'anion le plus abondant dans l'organisme (Nilius et Droogmans, 2003). Les différents types de canaux de chlore peuvent être activés par le voltage membranaire, des variations de volume, la liaison de molécules de signalisation, une variété d'ions, la phosphorylation de résidus intracellulaires par des protéines kinases ou par la liaison ou l'hydrolyse d'ATP. Les canaux de chlore sont présents sur la membrane plasmique et sur les membranes des organelles intracellulaires de la plupart des cellules eucaryotes. Ils interviennent dans de très nombreux processus physiologiques comme le maintien du potentiel membranaire, l'excitabilité musculaire et la physiologie cardiaque, la régulation du volume cellulaire, le transport transépithélial, les sécrétions digestives, pulmonaires et rénales, l'homéostasie du pH intracellulaire, la prolifération et la différenciation cellulaire (Teulon et Vandewalle, 2002).

Il est difficile d'établir une classification des canaux de chlore, car les mécanismes d'activation des différents canaux et leurs localisations s'entrecroisent et peu de canaux de chlore ont été clonés. Toutefois, sur un plan structural on peut distinguer trois classes de canaux chlore (Jentsch *et al.*, 2002):

1 - Le canal régulateur transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR) où l'ouverture de ce canal est contrôlée par l'ATP intracellulaire et l'AMPc. Ce canal fait partie de la superfamille des transporteurs ABC « ATP Binding Cassette ».

2 - Les canaux récepteurs de chlore de type GABA et glycine.

3- La famille des canaux de chlore (ClC) comportant jusqu'à ce jour neuf membres.

Suite à cette classification, deux autres familles de canaux de chlore existent, c'est-à-dire les canaux de chlore activés par un gonflement (VRAC) et les canaux de chlore activés par le calcium (CACC). L'étude des gènes codant pour ces familles moléculaires de canaux de chlore n'est pas aussi approfondie que les trois autres classes mentionnées plus haut. Il est à noter que les canaux de chlore peuvent également être classés en fonction de leur conductance unitaire : les canaux de chlore de conductance élevée (entre 200 et 500 pS), les canaux rectifiants sortants (ORCC) (30-70 pS) et les canaux de faible conductance (moins de 20 pS) (Jentsch *et al.*, 2002; Nilius et Droogmans, 2003).

3.1.1 Le canal régulateur transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR)

Le canal CFTR a été identifié lors de la recherche du gène de la fibrose kystique. En effet, les mutations des gènes du CFTR sont à l'origine de cette maladie autosomale à caractère récessif, nommée également mucoviscidose. Le canal CFTR est une glycoprotéine composée de 1480 acides aminés avec la présence de 12 domaines transmembranaires, deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD) et un domaine régulateur R (Jentsch *et al.*, 2002). Le CFTR est un canal à anion indépendant du voltage et sa séquence à la perméabilité aux anions est $\text{Br}^- \geq \text{Cl}^- > \Gamma^- > \text{F}^-$. Une phosphorylation de base par les PKA et PKC est nécessaire pour entraîner l'activation du canal. L'ouverture et la fermeture du canal sont aussi limitées par la présence d'ATP hydrolysable. Le canal CFTR peut également réguler d'autres protéines plus particulièrement les ORCC. Un mécanisme proposé de cette régulation est basé sur l'activation de CFTR par les PKA qui stimule la production d'ATP. L'ATP à son tour active les ORCC via des récepteurs purinergiques. Quoique ce mécanisme soit possible, il est sûrement plus complexe, puisque le relâchement d'ATP ne se fait probablement pas par les CFTR (Ostedgaard, Baldursson et Welsh, 2001). Le CFTR est exprimé chez une variété d'épithéliums sur les membranes apicales plus particulièrement dans l'intestin, les poumons, les glandes sécrétrices, les conduits biliaires et les épидидymes. L'activité du

CFTR est cruciale pour le processus du transport transépithélial. Conséquemment, les patients atteints de la mucoviscidose démontrent une sévère altération de la sécrétion épithéliale des fluides et du sel ainsi qu'une altération de la réabsorption (Sheppard et Welsh, 1999).

3.1.2 Les canaux récepteurs de chlore de type GABA et glycine

Le GABA et la glycine sont deux principaux médiateurs inhibiteurs de la neurotransmission du système nerveux central. Leurs liaisons avec leurs récepteurs créent l'ouverture des canaux à anion menant principalement à un influx de chlore. Cet influx hyperpolarise le neurone et inhibe l'activité neuronale. Les récepteurs à GABA et à glycine ainsi que le récepteur nicotinique de l'acétylcholine appartiennent à la superfamille des canaux ioniques avec ligand (LGIC) (Betz, 1990). Ils ont une structure commune où cinq sous-unités forment un canal ionique. Chaque unité consiste en un grand domaine extracellulaire d'environ 200 acides aminés en N-terminal, quatre domaines transmembranaires et un court domaine extracellulaire en C-terminal. La séquence de la perméabilité relative du récepteur à glycine est $SCN^- > NO_3^- > \Gamma > Br^- > Cl^- > F^-$, tandis que celle du récepteur à GABA est $SCN^- > \Gamma > Br^- > Cl^- \gg F^-$. Il est à noter qu'il y a trois types de récepteurs à GABA classés selon leurs propriétés pharmacologiques et électrophysiologiques : le récepteur à GABA_A et le récepteur à GABA_C sont des canaux de chlore, et le récepteur à GABA_B est un récepteur couplé à la protéine G (Jentsch *et al.*, 2002).

3.1.3 La famille des canaux de chlore (CIC)

Le clonage d'un canal de chlore dans l'organe électrique de la torpille en 1990 par l'équipe Jentsch, Steinmeyer et Schwarz a permis l'identification d'une vaste famille de canaux de chlore (CIC) exprimée autant chez les bactéries, les plantes et les mammifères. Six membres de la famille des CIC ont été identifiés chez le nématode *Caenorhabditis elegans* tandis que neuf membres ont été identifiés chez les mammifères. Chez les mammifères, les membres sont regroupés en trois sous-familles basées sur leurs

séquences d'homologies : i - CIC-1, CIC-2, CIC-Ka et CIC-Kb, ii - CIC-3, -4, -5 et iii – CIC-6 et CIC-7. La figure 5 identifie les trois sous-classes de la famille des canaux de chlore. Les membres du premier groupe sont retrouvés sur la membrane plasmique des cellules, tandis que les membres des deux autres groupes résident plutôt sur les membranes intracellulaires, quoique certains membres peuvent aussi être retrouvés sur la membrane plasmique (Teulon et Vandewalle, 2002). Les CIC possèdent également une distribution tissulaire et cellulaire très diversifiée. Ils sont des protéines membranaires constituées d'hélices- α , de 10 à 12 domaines transmembranaires et d'un site de glycosylation. De plus, les domaines C-terminale et N-terminale sont situés dans la cytoplasme (Mindell et Maduke, 2001). Structuralement, les CIC sont uniques puisqu'ils sont constitués de deux pores de conduction par canal (double pore) (Estevez et Jentsch, 2002). Une caractéristique commune de la famille des CIC est leur sensibilité au voltage. Le mécanisme des canaux sensibles au voltage est complexe et est régulé par la présence du double pore. Les CIC sont activés suite à une dépolarisation et l'ouverture des canaux est contrôlée par le Cl^- qui se fixe sur deux sites de liaison situés dans les pores de conduction. La différence de potentiel transmembranaire influence la fixation de l'anion qui confère la sensibilité au voltage (Teulon et Vandewalle, 2002). Les effets du voltage diffèrent selon le type de canal. Par exemple, le CIC-1 se ferme suite à une hyperpolarisation tandis que le CIC-2 s'ouvre. La séquence de la perméabilité relative de tous les CIC est $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \Gamma$ et varie selon le pH. Par exemple, la perméabilité relative lors d'un pH faible devient plutôt $\Gamma > \text{Cl}^-$ (Nilius et Droogmans, 2003).

Les caractéristiques et les fonctions physiologiques de chacun des membres de la famille des CIC restent hypothétiques. En effet, les fonctions ainsi que les emplacements spécifiques de chacun des CIC restent à être découverts ou sont controversés. En plus de la sensibilité au voltage, certains CIC peuvent être activés par d'autres facteurs comme le pH, le changement de volume de la cellule et la phosphorylation (Mindell et Maduke, 2001). Le canal CIC-1 est exprimé dans les muscles squelettiques et sa conductance est de 1 pS (Nilius et Droogmans, 2003). Il possède une haute probabilité d'ouverture à un potentiel membranaire négatif et contribue de 70 à 80 % à la conductance de repos des

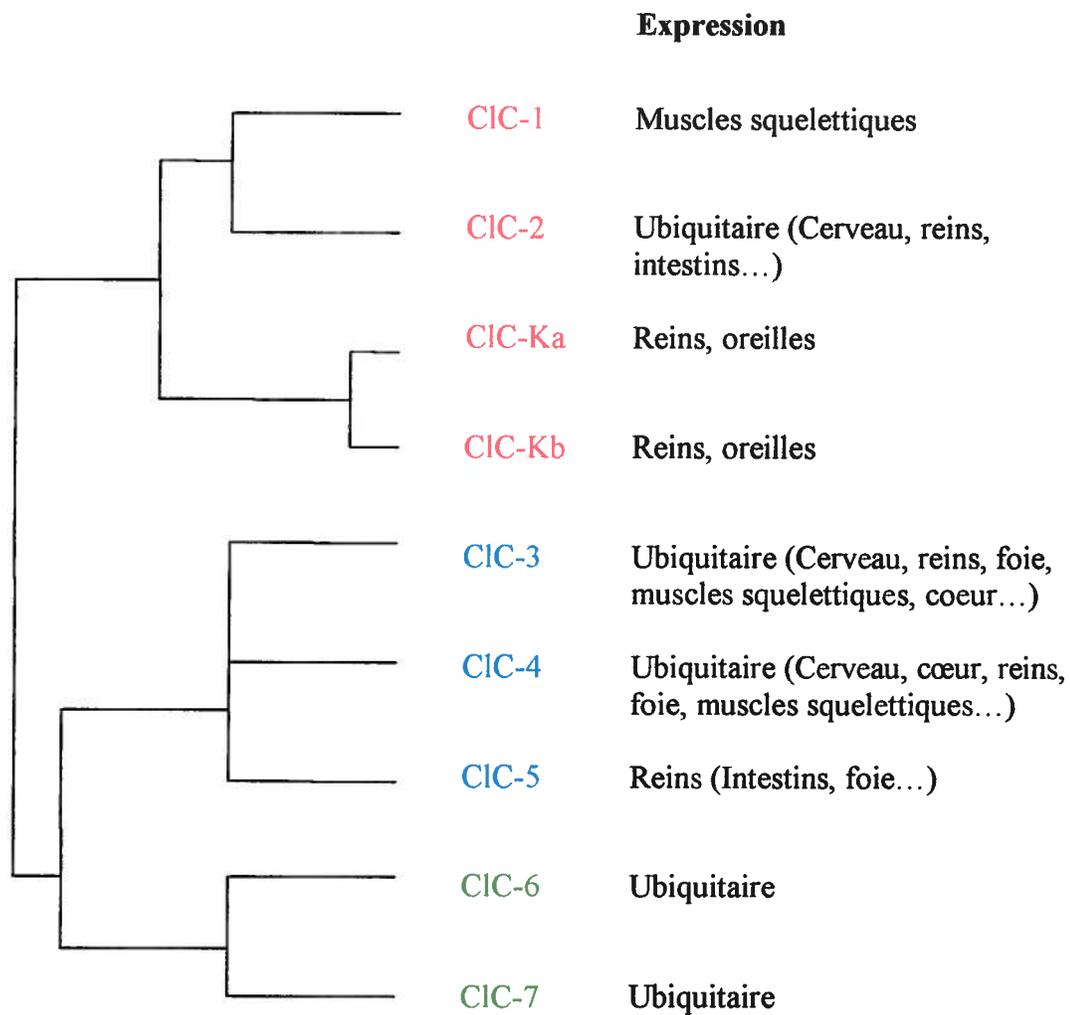


Figure 5 : Les trois sous-classes de la famille des canaux de chlore et leurs principales expressions.

(Modifié de Jentsch *et al.*, 2002 ; Nilius et Droogmans, 2003)

membranes musculaires (Jentsch *et al.*, 2002). Il stabilise le potentiel membranaire et contribue à la dépolarisation durant le potentiel d'action. Des mutations du gène codant pour CIC-1 entraînent une myotonie, c'est-à-dire une hyperexcitabilité des muscles (Jentsch *et al.*, 1999). L'expression de CIC-2 est ubiquitaire, fortement retrouvée dans le cerveau, les reins et les intestins. Il possède une conductance de 3 pS et est activé par une hyperpolarisation, un gonflement cellulaire et une acidose extracellulaire. Il peut également être activé par la PKA, l'acide arachidonique, l'amidation et l'oméprazole activée (Nilius et Droogmans, 2003). Il joue un rôle important dans l'homéostasie du pH intracellulaire et du milieu extracellulaire où se trouvent plusieurs interactions cellulaires. Il est aussi impliqué dans la phagocytose, le transport transépithélial et la régulation ramenant le volume à des valeurs contrôles (RVD) (Britton *et al.*, 2000; Nilius et Droogmans, 2003). Il semble détenir aussi un rôle dans la barrière hématospermiq ue et dans la couche pigmentée externe de la rétine, puisqu'un défaut de son fonctionnement mène à une dégénérescence testiculaire et rétinale (Roman *et al.*, 2001). Les canaux CIC-Ka et CIC-Kb sont des canaux rectifiants sortants (ORCC) inhibés par une acidose extracellulaire et potentialisés par une augmentation du calcium extracellulaire. Les canaux CIC-K sont coexprimés avec une petite protéine nommée Barttin. Les hétérodimères CIC-K/Barttin exprimés dans les reins et les oreilles, détiennent une fonction de transport transépithélial. Des mutations de la protéine Barttin chez l'humain mènent au syndrome de Bartter accompagné de surdité et d'une faiblesse des reins (Jentsch *et al.*, 2002; Teulon et Vandewalle, 2002). Le CIC-3 est exprimé ubiquitairement incluant le cerveau, les reins, le foie, les muscles squelettiques, le cœur, les glandes adrénales et le pancréas. Il est un canal rectifiant sortant (ORCC), il possède une conductance de 40 pS et il est constamment ouvert lorsqu'il est présent sur la membrane plasmique. Son activité est augmentée par le gonflement cellulaire et inhibée par la calmoduline kinase II et l'activation de la PKC (Britton *et al.*, 2000; Nilius et Droogmans, 2003). Une perturbation de l'expression de CIC-3 chez la souris mène à une dégénérescence sévère de l'hippocampe et de la rétine (Stobrawa *et al.*, 2001). Les canaux CIC-4, -5, -6 et -7 sont beaucoup moins connus. CIC-4 est exprimé dans le cerveau, le cœur, les reins, le foie et les muscles squelettiques. Il possède une conductance de 3 pS, il constitue un canal rectifiant sortant (ORCC) et est inhibé par une

acidose extracellulaire. Il semble détenir une fonction sur la bordure en brosse des entérocytes, probablement en formant une autre voie alternative de la sécrétion intestinale principalement créée par les canaux CFTR (Nilius et Droogmans, 2003). L'expression du ClC-5 prédomine dans le rein, localisée dans les endosomes et lysosomes du tube proximal. Il détient des propriétés similaires au ClC-4 et joue un rôle dans l'endocytose ainsi que dans la maladie de Dent, caractérisée par une protéinurie et une hypercalciurie (Valverde, 1999). L'analyse des canaux ClC-6 et ClC-7 reste encore à être effectuée. Toutefois, ils détiennent une expression cellulaire très large et ClC-7 est exprimé sur la membrane lysosomale et sur la bordure plissée des ostéoclastes. Le canal ClC-7 semble jouer un rôle dans la régulation du pH des lacunes extracellulaires où s'effectue la résorption osseuse (Kornak *et al.*, 2001; Teulon et Vandewalle, 2002).

3.1.4 Les canaux de chlore activés par un gonflement (VRAC)

Les canaux de chlore activés par un gonflement nommé VRAC jouent un rôle clé dans la régulation du volume cellulaire dont le mécanisme d'action est expliqué un peu plus loin. Ils sont également dénommés sous d'autres abréviations comme VSOAC, ORCC, VRC ou VSOR (Jentsch *et al.*, 1999; Jentsch *et al.*, 2002). Plusieurs autres fonctions sont attribuées aux VRAC. Ils induisent une conductance de chlore qui contribue au potentiel membranaire et aux autres systèmes de transport. Dépendamment du potentiel membranaire, les canaux VRAC peuvent soit créer une dépolarisation ou une hyperpolarisation. Ils modulent l'activité cardiaque en affectant la repolarisation du potentiel d'action. Ils sont impliqués dans le transport transcellulaire de Cl^- et conséquemment dans la sécrétion des fluides. Ils sont également impliqués dans la prolifération cellulaire puisque l'inhibition de VRAC supprime la prolifération de plusieurs types cellulaires, dont les lymphocytes T, les microglies, les hépatocytes et les cellules endothéliales. Les membres de la famille VRAC n'ont pas été identifiés au niveau moléculaire. Néanmoins, ils possèdent une conductance de 50 à 90 pS à des voltages dépolarisés et d'environ 10 pS à des potentiels hyperpolarisés. La séquence de perméabilité des canaux VRAC est $\text{SCN}^- > \Gamma > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$. Ils sont également

perméables au bicarbonate leur donnant un rôle dans la régulation du pH (Nilius et Droogmans, 2003).

3.1.5 Les canaux de chlore activés par le calcium (CACC)

Les canaux de chlore activés par le calcium (CACC) régulent la perméabilité membranaire du Cl^- chez plusieurs types cellulaires. Ils sont retrouvés, entre autres, chez les cellules épithéliales, les cellules cardiaques, les neurones, les cellules des muscles lisses et les cellules sanguines. Les CACC modulent l'excitabilité des neurones et des cellules musculaires. Chez les cellules des récepteurs olfactifs, les CACC jouent un rôle dans la transduction du signal, tandis que chez les cellules épithéliales ils détiennent un rôle important dans le transport transépithélial. Ils sont activés par une sensibilité au voltage lors d'une augmentation de calcium intracellulaire dues à la liaison du calcium au canal (Jentsch *et al.*, 2002). Ils possèdent une faible conductance allant de 0.5 pS à 5 pS et leur séquence de perméabilité est $\text{SCN}^- > \Gamma > \text{Cl}^-$. Leur activation est accélérée et leur rectification des ions sortants est diminuée lors d'une augmentation du calcium intracellulaire. De plus, leur sensibilité au calcium est diminuée à des potentiels de plus en plus négatifs (Nilius et Droogmans, 2003). L'activation des CACC peut également impliquer la phosphorylation par la protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline (CAMKII) (Wang et Kotlikoff, 1997).

3.2 Expression des canaux de chlore chez les lymphocytes

L'expression des différents canaux de chlore par les lymphocytes reste encore à être analysée. Toutefois, à ce jour, quelques canaux de chlore ont été identifiés. Le canal CFTR est exprimé chez les lymphocytes, mais le rôle physiologique de ce canal chez ce type cellulaire n'est pas clair. Cependant, des lymphocytes B possédant le gène de la mucoviscidose détiennent un défaut dans la régulation de la sécrétion d'anticorps et de cytokines pouvant réduire conséquemment la réponse à la présentation de l'antigène et à l'élimination de l'antigène (Bubien, 2001). Différents membres de la famille CIC sont

exprimés chez les lymphocytes dont les canaux CIC-2, CIC-3, CIC-4 et CIC-5. Tandis que CIC-2 est faiblement exprimé chez les lymphocytes B et T, CIC-3 est plutôt fortement exprimé chez les deux types de cellules matures et immatures. CIC-5 est également exprimé chez les lymphocytes B et T et CIC-4 est principalement exprimé chez les lymphocytes B (Cahalan, Wulff et Chandy, 2001 ; Jiang *et al.*, 2002). Il est à noter que l'expression de ces canaux reste à être étudiée puisque peu de travaux ont été effectués sur l'identification de l'expression de ces canaux chez les lymphocytes. Les lymphocytes possèdent également des canaux rectifiants sortants (ORCC) qui contrôlent entre autres le volume de la cellule dont CIC-2 et CIC-3 représentent des candidats possibles (Britton *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2002; Nilius et Droogmans, 2003) .

3.2.1 Mécanisme de la régulation ionique par les ions Cl⁻

Les canaux ioniques régulent une variété de processus importants pour la fonction normale d'une cellule incluant l'homéostasie ionique, la régulation du volume cellulaire, l'activation et la prolifération cellulaire. L'activité de plusieurs types de canaux ioniques est retrouvée chez les lymphocytes T. Une variété de stimuli externes module l'activité des canaux ioniques dont principalement l'activité des canaux à K⁺ sensibles au voltage. Durant la stimulation antigénique les canaux de calcium et les canaux de K⁺ activés par le calcium deviennent actifs et stimulent la mobilisation du calcium retrouvée essentielle pour plusieurs événements (Premack et Gardner, 1991). Les canaux de chlore jouent également un rôle important chez les lymphocytes T. En effet, la présence d'un bloqueur des canaux de chlore inhibe l'activation et la signalisation intracellulaire des lymphocytes. Un rôle possible des canaux de chlore est le maintien d'un potentiel membranaire négatif nécessaire pour un influx de calcium (Phipps, Branch et Schlichter, 1996). Les lymphocytes doivent détenir la capacité de réguler leur propre volume pour le maintien de leurs propriétés fonctionnelles et de leur survie. Cette capacité est principalement maintenue par les canaux de chlore impliqués dans la régulation du volume cellulaire et de l'homéostasie du pH. Cette régulation essentielle permet, par exemple, le passage des lymphocytes dans la microcirculation rénale et les espaces

intestinaux, où plusieurs changements osmolaires sont possibles (Cahalan, Wulff et Chandy, 2001).

Les cellules sont couramment exposées à des changements de l'osmolarité du milieu extracellulaire. De plus, les différentes activités cellulaires induisent des fluctuations de l'osmolarité intracellulaire dues aux changements du transport des osmolytes et du métabolisme. Dans ces conditions, les cellules peuvent réguler leur volume cellulaire suite à une diminution ou à un gonflement de la cellule. Deux mécanismes connus sont responsables de cette régulation : la diminution régulatrice du volume (RVD) et l'augmentation régulatrice du volume (RVI) qui entraîne un flux d'eau par un efflux de KCl et un influx de NaCl respectivement. Ces mécanismes de régulation sont d'une grande importance puisque des variations de la concentration des ions peuvent mener à des perturbations de la structures des macromolécules (Okada *et al.*, 2001).

L'application brusque d'un milieu extracellulaire hyperosmotique entraîne une diminution rapide du volume cellulaire qui se produit par une sortie osmotique d'eau. La régulation du volume se fait par le mécanisme RVI qui est beaucoup moins rapide que le mécanisme de régulation RVD. Lors de la diminution du volume cellulaire par osmolarité, un influx de NaCl régulateur du volume est produit par trois mécanismes de co-transporteurs, c'est-à-dire par les antiporteurs $\text{Na}^+\text{-H}^+$ et $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ ou par les deux symporteurs $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ et $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ (Okada *et al.*, 2001). Lors de l'application brusque d'un milieu extracellulaire hypoosmotique, les cellules gonflent rapidement par une entrée osmotique d'eau. Le gonflement est proportionnel au choc osmotique ne dépassant pas une certaine limite où une lyse de la membrane plasmique peut se produire. Rapidement, le mécanisme RVD s'active et ramène le volume cellulaire à la normal. Ce mécanisme implique la régulation des ions Cl^- et K^+ (Okada et Maeno, 2001). En effet, lors d'un gonflement cellulaire osmotique, un efflux de KCl régulateur du volume est induit par l'activation des canaux K^+ et Cl^- sensibles au volume ainsi que par les antiporteurs $\text{K}^+\text{-H}^+$ et $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$. Le mécanisme RVD implique principalement les canaux VRAC où l'identité moléculaire de ces canaux n'est pas éclaircie (Nilius et Droogmans, 2003). Ces canaux sont activés, entre autres, suite à un étirement de la

membrane plasmique. Une hypothèse du fonctionnement de ces canaux consiste à l'ouverture des canaux lors d'un gonflement de la cellule entraînant la dépolarisation de la membrane qui active les canaux à K^+ menant à un efflux de KCl et une sortie d'eau. Les canaux VRAC sont également impliqués dans la régulation du pH possiblement en permettant la sortie et l'entrée des ions HCO_3^- (Okada *et al.*, 2001).

3.2.2 Importance de la régulation ionique dans l'apoptose

La diminution du volume cellulaire et l'acidification intracellulaire sont deux caractéristiques attribuées à l'apoptose. La diminution du volume cellulaire se produit en deux phases différentes : une première phase qui débute avant la fragmentation de l'ADN ou la formation de corps apoptotiques et une deuxième phase associée avec la fragmentation de l'ADN. La première phase représente la diminution du volume lors de l'apoptose nommée AVD (Okada *et al.*, 2001). Le processus AVD se produit dans des conditions isotoniques. Néanmoins, un choc hypertonique peut également induire l'apoptose chez une variété de types cellulaires (Bortner et Cidlowski, 1999; Matthews et Feldman, 1996; Morales *et al.*, 2000). Le mécanisme AVD s'engendre sans l'induction du mécanisme RVI et semble activé des canaux de chlore et/ou des canaux de K^+ sensibles au volume (Maeno *et al.*, 2000). L'activation de ces canaux permet un influx de KCl et une sortie d'eau diminuant le volume cellulaire (Okada *et al.*, 2001). Les canaux de chlore impliqués dans le mécanisme AVD ne sont pas encore déterminés. Toutefois, les canaux VRAC semblent être impliqués dans ce mécanisme. En effet, l'utilisation de bloqueurs de canaux anioniques empêche l'activation du mécanisme AVD chez des cellules lymphoïdes, épithéliales et neuronales (Maeno *et al.*, 2000). De plus, l'induction de l'apoptose par la stimulation de Fas induit l'activation de canaux de chlore rectifiants sortants (ORCC) chez des lymphocytes T (Szabo *et al.*, 1998).

L'importance et le rôle de la perte de volume cellulaire et de l'acidification intracellulaire lors de l'apoptose restent à être déterminés. La perte de volume peut être une caractéristique secondaire passive ou un déclencheur des événements biochimiques apoptotiques. Toutefois, il est connu que le processus AVD se produit avant plusieurs

événements biochimiques comme l'activation de la caspase-3, le relâchement du cytochrome c et la fragmentation de l'ADN. La figure 6 démontre les mécanismes de régulation du volume cellulaire (RVD, RVI et AVD) et le processus apoptotique menant à la mort cellulaire. Le processus AVD peut être inhibé par des bloqueurs des canaux de Cl^- ou de K^+ qui inhibent subséquemment les événements biochimiques apoptotiques, ainsi que la mort de la cellule (Yu et Choi, 2000). De plus, des inhibiteurs des caspases n'ont aucun effet sur le processus AVD, mais bloquent la mort cellulaire (Maeno *et al.*, 2000). Plusieurs travaux ont démontré que AVD est bien un événement précoce dans l'apoptose. Des thymocytes de rats exposés à des irradiations (Klassen *et al.*, 1993) ou des cellules épithéliales rénales injectées au cytochrome c (Chang *et al.*, 2000) présentent le mécanisme AVD après 30 à 60 minutes avant la plupart des changements morphologiques. Des cellules lymphoïdes U937 présentent le processus AVD une heure après l'exposition à la staurosporine tandis que l'activation de la caspase-3, le relâchement du cytochrome c, la fragmentation de l'ADN et la perte de viabilité nécessitent plus de deux heures. Des effets similaires sont observés chez d'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales HeLa et les cellules neuronales NG108-15 (Maeno *et al.*, 2000). Malgré que le processus AVD semble être un événement précoce de l'apoptose, d'autres événements se produisent avant ce phénomène dont la réduction de la synthèse protéique, la perturbation du potentiel mitochondrial et l'activation de certaines kinases (Deckwerth et Johnson, 1993; Zamzami *et al.*, 1995). Il est à noter que le processus apoptotique peut varier selon le type cellulaire et le stimulus apoptotique.

La relation entre l'efflux de K^+ , l'efflux de Cl^- , le processus AVD et la mort par apoptose reste à être approfondi. Un efflux de Cl^- peut induire l'accompagnement d'un efflux de K^+ ou vice versa. L'utilisation de bloqueurs de canaux de K^+ ou de Cl^- inhibe l'efflux des deux ions (Nilius *et al.*, 1995). En plus de faciliter AVD, l'efflux de K^+ semble promouvoir deux événements importants de l'apoptose, c'est-à-dire l'activation des caspases et des endonucléases. En effet, une augmentation de la concentration intracellulaire de K^+ inhibe l'activation de la pro-caspase-3 ainsi que la fragmentation de l'ADN (Hughes *et al.*, 1997). Conséquemment, plusieurs enzymes et processus cellulaires peuvent être sensibles à la concentration intracellulaire de K^+ . Il a été proposé

STRESS HYPERTONIQUE

STRESS HYPOTONIQUE

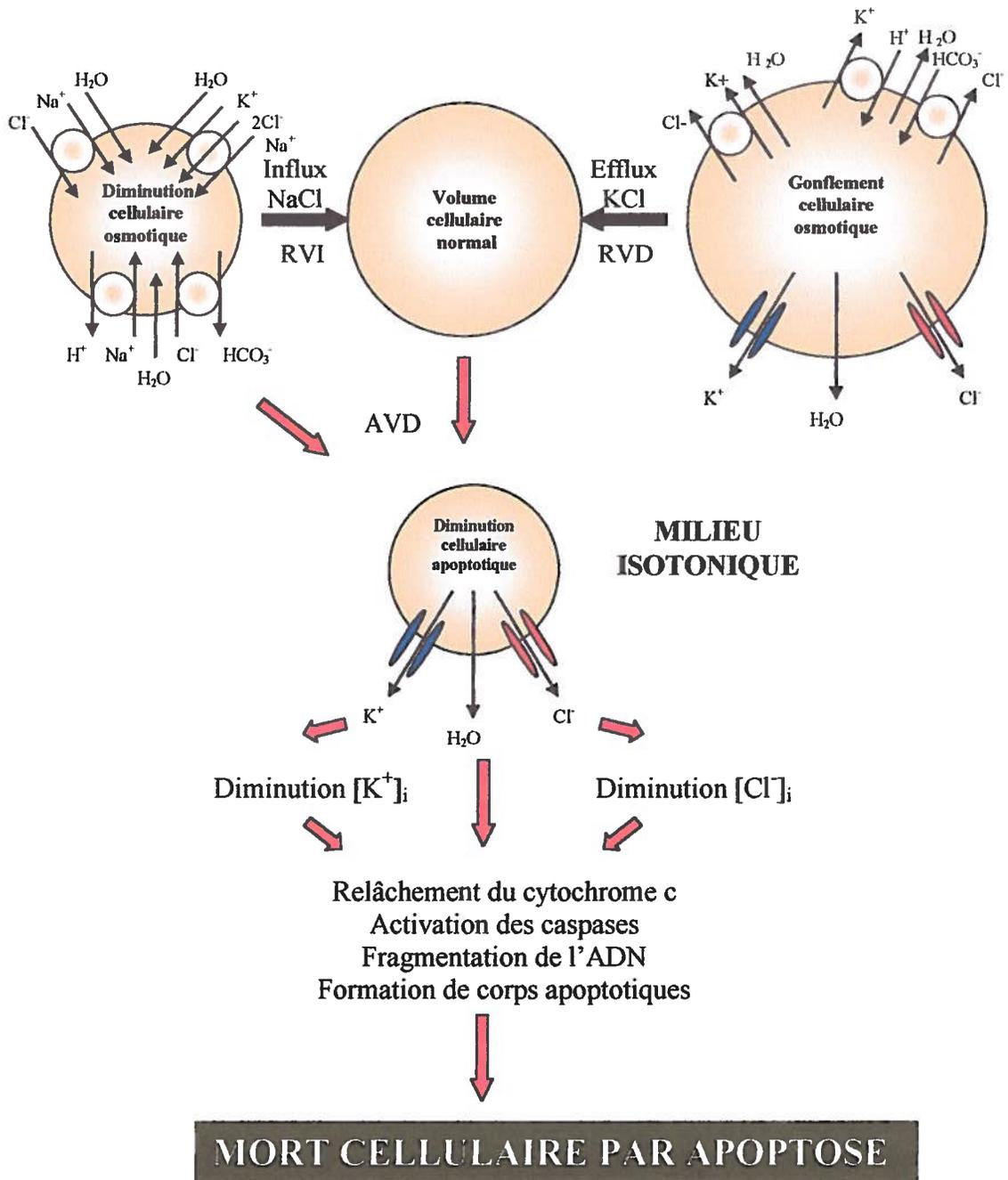


Figure 6 : Modèle schématique des relations entre les mécanismes de régulation du volume cellulaire (RVD, RVI et AVD) et le processus apoptotique menant à la mort cellulaire.

(Tiré de Okada et Maeno, 2001)

que l'ouverture des canaux de chlore permet une augmentation de l'efflux de HCO_3^- induisant ainsi une acidification intracellulaire et une augmentation de l'activité des endonucléases (Szabo *et al.*, 1998). De plus, des cellules leucémiques exposées à un stimulus apoptotique et possédant une inhibition de l'efflux de chlore, démontrent une inhibition de la fragmentation de l'ADN (Rasola *et al.*, 1999). Il a aussi été suggéré que l'acidification intracellulaire est associée avec la phase initiatrice de l'apoptose, mais le rôle de l'acidification dans la phase exécutive n'est pas éclairci. En effet, des cellules HL-60 traitées à l'imidazole, qui induit l'apoptose et affecte le pH intracellulaire, démontrent un pH intracellulaire acide, une augmentation de l'activation de la caspase-3, un clivage du DFF45, quoique la fragmentation oligonucléosomale de l'ADN soit absente. La neutralisation du pH intracellulaire durant la phase exécutive mène à la fragmentation de l'ADN suggérant que le maintien d'un pH intracellulaire neutre durant la phase exécutive est nécessaire à la fragmentation de l'ADN (Iguchi *et al.*, 2002). Toutefois, le rôle du pH intracellulaire dans l'activation de différentes protéines enzymatiques reste à être éclairci.

L'importance de la régulation ionique lors de l'apoptose devient évidente lors de l'exposition des cellules à un milieu hyperosmolaire. Cette exposition induit l'apoptose chez les cellules normales et chez les cellules déficientes pour le mécanisme RVI (Yu, Canzoniero et Choi, 2001). Cependant, il est possible que le stimulus apoptotique active un facteur de signalisation intracellulaire qui stimule l'activation des canaux VRAC et une série d'événements biochimiques menant à l'activation des caspases. En effet, plusieurs enzymes sont impliquées dans la régulation des canaux VRAC dont la MAPK (Crépel *et al.*, 1998) et la PI3K (Feranchak *et al.*, 1998; Okada et Maeno, 2001). Une élucidation future du mécanisme moléculaire en amont du processus AVD sera nécessaire pour comprendre la phase précoce de l'apoptose et l'initialisation de la régulation du volume cellulaire.

3.3 Régulation des canaux de chlore

Le mécanisme de régulation des canaux de chlore n'est pas, à ce jour, éclairci. Toutefois, plusieurs molécules ont été identifiées comme régulatrices de ces canaux. La phosphorylation est impliquée dans la régulation de plusieurs types de canaux de chlore. L'activation des canaux VRAC, entre autres, chez les lymphocytes T nécessite la présence d'ATP (Lepple-Wienhues *et al.*, 2000). L'implication de la phosphorylation provient principalement de l'inhibition des canaux VRAC chez des cellules intestinales, cardiaques et endothéliales par des inhibiteurs de tyrosines kinases. Chez les lymphocytes T le mécanisme RVD est bloqué par des inhibiteurs de tyrosines kinases et par la déficience de l'expression de la p56^{lck} membre de la famille Src. La retransfection du gène p56^{lck} rétablit le mécanisme RVD et active un courant osmotique. De plus, le gonflement cellulaire induit par un milieu hypotonique augmente l'activité de la p56^{lck}. Les lymphocytes T déficients pour l'expression de la p56^{lck} démontrent une activation partielle des VRAC démontrant l'implication de la p56^{lck}, mais également la possibilité d'une implication d'autres kinases, comme la p59^{lyn} un autre membre de la famille Src exprimé, entre autres, chez les lymphocytes T (Lepple-Wienhues *et al.*, 1998; Lepple-Wienhues *et al.*, 2000). La p56^{lck} est également activée suite à la stimulation de Fas et l'acidification intracellulaire caractéristique à l'apoptose est inhibée par l'inhibition des ORCC ou de la p56^{lck} (Szabo *et al.*, 1998). D'autres kinases sont également impliquées dans l'activation des canaux de chlore. Les canaux CFTR sont activés par la PKA dépendante de l'AMPc et l'effet de cette kinase est augmenté par la PKC (Jia, Mathews et Hanrahan, 1997; Seibert *et al.*, 1999). La p60^{c-src} active l'ouverture des canaux CFTR chez des fibroblastes transfectés avec le gène CFTR (Fischer et Machen, 1996). Les canaux CACC sont activés via la phosphorylation de la CaMKII chez les lymphocytes T Jurkat (Nishimoto *et al.*, 1991). Chez des hépatocytes, la PI3K joue un rôle sur la régulation du volume cellulaire en modulant le relâchement d'ATP (Feranchak *et al.*, 1998). Les MAPK Erk1 et Erk2 jouent un rôle dans l'activation des VRAC chez les astrocytes. Étant donné que ces MAPK sont des substrats d'une cascade de tyrosines kinases d'autres tyrosines kinases peuvent aussi être impliquées (Crepel *et al.*, 1998). Chez des cellules endothéliales de bovin, l'inhibition de la Rho kinase atténue

l'activation des canaux VRAC (Nilius *et al.*, 1999). D'autres molécules sont suggérées comme influençant également les mécanismes d'activation des canaux de chlore : les protéines tyrosines phosphatases (Thoroed, Bryan-sisneros et doroshenko, 1999); l'acide arachidonique et ses métabolites (Lambert, 1987); les protéines G dont le récepteur leucotriène D₄ (Lambert, 1989), le récepteur thrombine (Manolopoulos *et al.*, 1997) et le récepteur à l'endothéline ET_{A1} (Du et Sorota, 2000; Voets *et al.*, 1998); la régulation des canaux ORCC par les canaux CFTR (Hryciw et Guggino, 2000); l'actine (Ahmed *et al.*, 2000) et les glycoprotéines P (Idriss *et al.*, 2000). Les mécanismes de régulation des canaux de chlore varient selon le type cellulaire et restent à être approfondis.

SECTION 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

**Apoptotic volume decrease, pH acidification and chloride channel activation during
apoptosis requires CD45 expression in HPB-ALL T cells**

Geneviève Dupéré-Minier, Claudine Hamelin, Philippe Desharnais and Jacques Bernier
INRS-Institut Armand-Frappier, Pointe-Claire, Quebec, Canada, H9R 1G6

Correspondance to :

Jacques Bernier, INRS-Institut Armand-Frappier,
245 Blvd Hymus, Pointe-Claire, Quebec, Canada, H9R 1G6

jacques.bernier@inrs-iaf.uquebec.ca

514-630-8813

Fax : 514-630-8850

Résumé

Des travaux antérieurs effectués dans notre laboratoire ont montré que l'absence du CD45 est responsable de l'inhibition d'apoptose nucléaire induite par des agents affectant le potentiel membranaire mitochondriale. Notre hypothèse est donc que l'absence du CD45 perturbe des substrats en aval de la famille Src ayant un rôle important dans l'apoptose et dans l'homéostasie ionique de la cellule. Notre hypothèse repose sur l'importance d'un efflux de chlore pour la fragmentation de l'ADN, le rôle de la p56^{lck} dans la fonction des canaux de chlore et l'activité régulatrice du CD45 sur cette kinase. Nos résultats démontrent une perturbation de l'homéostasie ionique chez les lymphocytes déficients pour l'expression du CD45 (CD45-) contrairement aux lymphocytes normaux (CD45+). Les niveaux de phosphorylation des canaux de chlore sont considérablement inhibés chez les CD45-, tandis que les niveaux d'expression de ces canaux sont semblables chez les deux types de cellules. Un milieu hypertonique inhibe la fragmentation de l'ADN chez les CD45+ tandis qu'un milieu hypotonique augmente cette fragmentation chez les CD45-. Le CD45 joue donc un rôle important dans l'apoptose nucléaire par la régulation des canaux de chlore responsables de l'homéostasie ionique de la cellule essentielle à l'activation du DFF40.

Abstract

The former work carried out in our laboratory showed that the absence of the CD45 is responsible for nuclear apoptosis inhibition. Our assumption is thus that the absence of CD45 disturbs substrates downstream of the Src family having a significant role in apoptosis and in ionic homeostasis of the cell. Our assumption rests on the importance of a chloride efflux on DNA fragmentation, the role of p56^{lck} in the function of the chloride channels and regulating activity of the CD45 on this kinase. Our results demonstrate a disturbance of ionic homeostasis in CD45 deficient lymphocytes (CD45⁻) in contrast to normal lymphocytes (CD45⁺). The phosphorylation levels of the chloride channels are considerably inhibited in CD45⁻, while the expression levels of these channels are similar in the two types of cells. A hypertonic medium inhibits DNA fragmentation in CD45⁺ while a hypotonic medium increases DNA fragmentation in CD45⁻. Thus the CD45 plays a significant role in nuclear apoptosis by the regulation of the chloride channels responsible for ionic homeostasis of the cell essential for the DFF40 activation.

Key words: apoptosis, DNA fragmentation, CD45, Src family kinases, chloride channel, ionic regulation

Introduction

Apoptosis or programmed cell death (PCD) is driven by a genetic cell program which alterations of this process are associated to diseases including cancer and degenerative disorders (1, 2). The PCD process is associated with a distinct set of biochemical and physical changes involving the cytoplasm, nucleus and plasma membrane (3). These changes include cell shrinkage, formation of apoptotic bodies, chromatin condensation, DNA degradation of high molecular weight (50-300 kb) and oligonucleosomal fragments (4). Various initiators of PCD, especially chemical agents, induced mitochondrial alterations; a central player of the apoptotic process. The mitochondrial dysfunction is associated with the loss of the inner membrane electrochemical gradient, cytochrome c and apoptosis-inducing factor (AIF) release. In the cytosol, cytochrome c forms a multiprotein complex leading to the activation of caspase-9 and downstream activation of caspase-3 (5, 6).

Caspase-3 mediates nuclear alterations by the cleavage of the inhibitory subunit of the heterodimeric DNA fragmentation factor (DFF45) or its murine homologue ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) (7, 8). During apoptosis, DFF45 can be cleaved by activated caspase-3 resulting in the activation of a 40-kDa endonuclease termed DNA fragmentation factor 40 (DFF40) or CPAN (caspase-activated nuclease) (8, 9). DFF40 is responsible for chromatin condensation and DNA fragmentation into nucleosomal fragments (10, 11).

Numerous studies have showed that DFF45 cleavage is not sufficient to lead to DFF40 endonuclease activity (11-15). In some lymphoma cells, it was suggested that structural and/or functional defects in DFF40 can explain the absence of nuclear apoptosis (12,15). Other studies propose the importance of ion homeostasis for the control of DFF40 somewhere downstream of caspase-3 activation and DFF40/DFF45 proteolysis. Indeed, it was established that DFF40 activity could be controlled by a Cl^- efflux-dependent process (11). While all the apoptosis hallmarks remain detectable, including the cleavage of DFF45, oligonucleosomal DNA cleavage is abolished if Cl^- efflux is prevented by using NaCl to raise extracellular osmolarity or by Cl^- channel blockers (11). Using BAPTA, an intracellular Ca^{2+} chelator, Zhang *et al.* (2001) proved that the inhibition of oligosomal DNA fragmentation is independent of DFF40 activation (13). Furthermore, imidazole-treated cells exhibited acidic intracellular pH (pHi), caspase-3 activation, DFF45 cleavage but not oligonucleosomal DNA fragmentation. However, maintaining pHi in the neutral range during the execution phase leads to DNA fragmentation (14).

Chloride channels (CIC) play an essential role in volume reduction and intracellular acidification during the apoptotic process (16). Deregulation of ion transport in apoptotic cells leads to changes in intracellular ion levels and disrupts enzyme activity. Indeed, cells can reduce their volume by a loss of Cl^- and K^+ while a decrease in intracellular $[\text{K}^+]$ optimizes DFF40 activity (17, 18).

Absence of DNA nucleosomal fragmentation was also reported in apoptosis triggered by the crosslinking of CD45 molecules a transmembrane tyrosine phosphatase expressed on

all nucleated cells of hematopoietic origin (19, 20). In this view, we have demonstrated, in a submitted but unpublished work, a new role for the tyrosine phosphatase CD45 in nuclear apoptosis induced by chemical-perturbing agents such as tributyltin (TBT) or H₂O₂. In contrast to wild-type cells (CD45+), CD45-deficient T cells (CD45-) are resistant to the induction of DNA fragmentation and chromatin condensation following TBT exposure. In both CD45+ and CD45- cell lines, other hallmarks of apoptosis are detectable including intracellular calcium mobilization, reduction of mitochondrial membrane potential, cytochrome c release, degradation of the NF-κB regulatory subunit IκB-α, caspase-3 activation and DFF45 cleavage. Based on these demonstrations, the aim of this study was to determine the role of CD45 in nuclear apoptosis.

CD45 is a phosphatase that plays a stimulatory role in TCR-mediated signaling pathways, by regulating the activity of Src tyrosine kinase family members namely p56^{lck} and p59^{lyn} (21, 22). Interestingly, it was recently demonstrated that chloride channels activities can be controlled by tyrosine phosphorylation and dephosphorylation (23-25). Therefore, CD45 and its substrates could be candidates responsible for the regulation of the ionic balance in apoptotic cells. Moreover, tyrosine kinase-dependent activation of chloride channel was demonstrated to be controlled by p56^{lck} (26-28). The involvement of chloride channels in osmoregulation could be of importance when cells actively change their volume during proliferation or apoptosis.

In this study, we demonstrated that CD45 deficient cell lines treated with TBT are resistant to nuclear apoptosis, showed a defect in tyrosine kinase activation, lose their

capacity to reduce their volume and intracellular pH acidification. We proved the absence of chloride channel phosphorylation on tyrosine residues and that a hypoosmotic shock could induce a partial oligosomal DNA fragmentation. Overall, our results show a role of CD45 molecules and their substrates in the osmoregulation of cells during apoptosis.

Materials and Methods

Cells and culture media

HPB-ALL T lymphoma CD4⁺CD8⁺ cell line and HPB-ALL CD45-deficient variant (HPB45.0) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were grown in RPMI 1640 (Bio-media Canada, Drummondville, Quebec, Canada) culture medium supplemented with 10 % heat-inactivated fetal calf serum, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Biosource, Montreal, Quebec, Canada). The final osmolarity of the standard medium was 290 mosM. Hyperosmotic conditions were obtained by directly adding 84 mM NaCl (400 mosM) or 105 mM NaCl (500 mosM). Hypoosmotic conditions (130 mosM, 150 mosM and 175 mosM) were obtained by adding deionized water to the culture medium.

Cell treatment

Cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and seeded in 24 well microplates at a density of 1×10^6 cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 0.1% BSA. The TBT (Tributyltin chloride 96 % purity, Aldrich, Milwaukee, WI, USA) stock solution (50 mM) was prepared in ethanol. Cells were exposed to 0.8 µM of TBT for different time points (5 min to 240 min). The inhibitor genistein was pre-incubated for 30 minutes prior to TBT treatment. Either hyper- or hypoosmotic conditions were adjusted 120 min before cell collection. Cells were afterward collected and washed twice with PBS.

Apoptosis assessment

Treated cells were resuspended in 300 μ l of Krishan buffer (0.1 % sodium citrate, 0.3 % NP-40, 20 μ g/ml RNase and 50 μ g/ml propidium iodide (PI)). Samples were incubated at 37°C for 60 min, harvested and analyzed by flow cytometry on a FACScan (Becton Dickinson, Oakville, ON, Canada). Analyses were performed using live gates to discriminate between doublets and cells exhibiting reduced DNA content corresponding to the sub G1/G0 diploid peak which was defined as apoptotic cells. The evaluation of internucleosomal DNA fragmentation was also performed by standard agarose gel electrophoresis. Briefly, treated cells were resuspended in 20 μ l of 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 % SDS, 10 mM EDTA, 0.1 mg/ml proteinase K and incubated at 50°C for 16 hours. Proteinase K was then heat-inactivated at 70°C for 10 minutes and 10 μ l of 10 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 0.5 mg/ml of RNase was added to sample and further incubated another 2 hours at 37°C. Samples were loaded on a 1.5 % agarose gel and electrophoresed at 45 V for 2.5 hours in TBE (0.5X). The DNA ladder was stained with EtBr and visualized by UV transillumination using a Fluor S-MultiImager (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Exposure of phosphatidylserine residues was analysed by the Guava Nexin Kit (Guava Technologies inc., California, USA). Briefly, after TBT exposure cells were resuspended in 1X Nexin buffer adjusted at 2×10^6 cells/ml. The cell suspension (40 μ l) was then incubated for 20 minutes on ice with 5 μ l of Annexin V-PE and 5 μ l of Nexin 7-AAD. To each reaction tube 450 μ l of cold 1X Nexin buffer was added. The cell suspension was vortexed and analyzed on Guava Technologies Personal Cytometer (PC) (Guava Technologies inc., California, USA).

Measurement of cell volume and intracellular pH

Following TBT exposure, cells were intentionally not washed to prevent cell volume variation and measurements were performed immediately on a FACScan flow cytometer. On the other hand, pH_i was determined as previously described (29). Briefly, cells were incubated with 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF-AM) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 30 min at 37°C before being collected. Cellular pH was analyzed at the optimal excitation wavelength of 488 nm on a FACScan flow cytometer.

Immunoprecipitation

Immunoblot was performed with 10×10^6 treated cells for each condition. After harvesting, cells were resuspended in lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02 % sodium azide, 1 % NP-40, 0.05 μ g/ml aprotinin, 0.05 μ g/ml leupeptin, 0.05 μ g/ml PMSF and 200 μ M orthovanadate) and incubated 30 min at 4°C with intermittent vortexing. Cell lysates were centrifugated and supernatants were incubated with pansorbin (Calbiochem), previously washed with lysis buffer, for 30 min at 4°C with gentle agitation. Cell lysates were centrifugated and supernatants were incubated with protein G-Sepharose (Pharmacia Biotech AB) and anti-CIC antibody for 60 min at 4°C with gentle agitation. The beads were pelleted by centrifugation and subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis.

Western blot Analysis

Equal amounts of whole cell lysates were resuspended in 30 μ l of sample buffer and heated at 100°C for 10 min. The proteins were loaded on a 7.5 % or 12 % SDS-PAGE and then transferred onto a nitrocellulose membrane. The proteins were then probed with anti-phosphotyrosine (4G10) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), rabbit anti-rat CIC-2, CIC-3, CIC-4 (Alpha Diagnostic Intl. Inc., San Antonio, USA), rabbit anti-human DFF45 (Imgenex, San Diego, USA) or mouse anti-human DFF40 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA). Detection was accomplished using a horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG and the ECL detection system (Amersham Biosciences).

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed by a one-way ANOVA comparison test using the Statistica 6.0 software program (Statsoft Inc., Tulsa, OK).

Results

Inhibition of nuclear apoptosis in TBT-treated CD45 deficient cells is linked to the tyrosine kinase activity.

Nuclear apoptosis show typical DNA degradation into oligonucleosomal fragments. We have observed in nuclear apoptosis, triggered by mitochondrial perturbing agents, such as TBT or H₂O₂, the involvement of CD45 tyrosine phosphatase for DNA cleavage. Indeed, contrary to the HPB-ALL wild-type, the HPB45.01 (CD45⁻) cell line deficient for the expression of the CD45 molecule, was resistant to the induction of internucleosomal DNA fragmentation after TBT exposure (Fig. 1A). Since CD45 regulates tyrosine kinases such as fyn or lck, this result suggests that the tyrosine kinase pathway may lead to the activation of endonucleases. To confirm the importance of the tyrosine phosphorylation pathway in nuclear apoptosis, the effects of a tyrosine kinase inhibitor, genistein, was evaluated following TBT exposure in CD45⁺ cells (Fig. 1B). Genistein completely inhibits the internucleosomal DNA fragmentation during TBT treatment in CD45⁺ cells. The inhibition of tyrosine kinase activity by genistein was confirmed by immunoblot analysis with an anti-phosphotyrosine mAb after exposure of cells to PHA, a T cell mitogen, or TBT (Fig.1B, right panel). Consequently, the present results suggest a direct role of tyrosine kinase in nuclear apoptosis.

To analyse if TBT could modulate the tyrosine kinase pathway, phosphotyrosine immunoblots were performed at different time points following TBT exposure. In HPB-

ALL CD45⁺ cells, a rise in tyrosine phosphorylation was observed after TBT treatment (Fig. 1C). Phosphotyrosine increases as early as 15 minutes post-exposure and was especially notable for a set of proteins of 110 kDa and 59-62 kDa. The absence of CD45 expression results in a hyperphosphorylated state of its substrates, thus the initial phosphorylation background was higher in CD45⁻ cells. There was no modulation in the tyrosine phosphorylation state of proteins induced in these cells.

Apoptotic volume decrease is absent in CD45 deficient cells.

Tyrosine kinase pathway represents an early event in T cells activation and in apoptosis. Activation of tyrosine kinase plays a major role when cells actively change their volume (30). Apoptotic volume decrease (AVD) occurs early, before characteristic ultrastructural or biochemical events (31). Moreover, AVD precedes DNA fragmentation and only cells with a reduced volume displayed DNA fragmentation (32). Thus, we wanted to determine if AVD occurs after TBT exposure in HPB-ALL and HPB45.0 cells. Incubating the cells in presence of TBT for 4 h lead to AVD in HPB-ALL but not to the same extent in HPB45.0 (Fig. 2A). Indeed, about 30% of HPB-ALL cells had a volume reduction after a 1h incubation as compared to 15% in HPB45.0 (Fig. 2B). Consequently, a relation exists between CD45 expression, tyrosine kinase activity and the control of AVD.

Absence of intracellular acidification and phosphatidylserine exposure in CD45 deficient cells.

Intracellular acidification and phosphatidylserine flipping are two hallmarks of apoptosis. A tight association between these two events exists in apoptotic cells (33,34). Since we have observed the absence of AVD, we have determined if CD45 expression is required for intracellular acidification. HPB-ALL and HPB45.0 cells were incubated with BCECF-AM, a probe used for monitoring intracellular pH changes. Following TBT exposure, a time dependent decrease of pH occurs in HPB-ALL cells (data not shown). After 4 h of TBT- triggering apoptosis, the fluorescence of BCECF was decreased by one log on more than 50% of cells when compared to untreated cells (Fig. 3A). In contrast, the lack of CD45 expression in HPB45.0 was associated with a reduction in % of cells where the intracytoplasmic acidification occurs (Fig. 3A). The intracellular acidification is required for phosphatidylserine flipping (34). Thus, to confirm the absence of acidification in HPB45.0 cells exposed to TBT, cells were labelled with FITC-annexin V. As expected, absence of intracellular acidification in HPB45.0 cells exposed to TBT correlates with the loss of phosphatidylserine flipping (Fig. 3B). In HPB-ALL, 30% of cells were positive for annexin V binding. Overall, our results suggest a disruption in ionic regulation when CD45 expression is lacking.

Absence of activation of ClC by phosphorylation on tyrosine residues in apoptotic CD45-deficient cell line.

Chloride channel activation participates in AVD, pH acidification and DNA fragmentation (35). We have observed in HPB-ALL, but not in HPB45.0, a rise of phosphotyrosine particularly around of 110 kDa. The family of Cl⁻ channel, ClC, have a molecular weight of about the same range and can represent a potential candidate. Despite the fact that the expression of ClC channels on HPB-ALL and HPB45.0 are not documented, we have determined the expression of ClC-2, ClC-3 and ClC-4, three channels previously related to ionic regulation (36-39). As shown in figure 4A, both cell lines express all members of selected chloride channels. Expression level of ClC-3 was the strongest followed by intermediate expression of ClC-4. ClC-2 expression level appeared to be the weakest among the chloride channels studied. Nevertheless, HPB-ALL and HPB45.0 express all forms of chloride channels studied and importantly chloride channel expressions are at comparable levels.

Tyrosine phosphorylation of chloride channels by tyrosine kinase led to their activation and Cl⁻ exchange (26-28). Consequently, a modification in their phosphorylation can be linked to changes in ionic homeostasis involved in apoptosis. Thus we sought to determine the influence of CD45 molecule expression in ClC phosphorylation during apoptosis induced by TBT. Both cell lines were exposed to vehicle or to TBT for 2 h and each ClC were immunoprecipitated independently. Tyrosine phosphorylations of ClC were determined by immunoblots with anti-phosphotyrosine antibody. As expected in

HPB-ALL, following an exposure to TBT, a significant increase of phosphotyrosine occurred in CLC-2 and CLC-3 (Fig.4B). Phosphorylation on tyrosine residues of CLC-4 increased moderately. Interestingly, in HPB45.0 which has loss CD45 expression, no changes in the state of phosphorylation were noted. Overall, our results suggest that the phosphorylation of CLC on tyrosine residues, which led to their activation, is under the control of tyrosine kinase regulated by CD45.

Hypoosmotic shock induced DNA fragmentation in apoptotic CD45-deficient cell line.

Since the inhibition of Cl^- efflux inhibits DNA fragmentation, (12) we analyzed if the induction of Cl^- efflux could induce DNA fragmentation in the absence of CD45 expression. By exposing HPB-ALL to a NaCl hyperosmotic shocks (400 mosM and 500 mosM) after 2h of TBT exposure, a significant reduction of DNA fragmentation was observed (Figure 5). This result proves that the suppression of Cl^- efflux inhibits nuclear apoptosis. On the other hand, DNA fragmentation in HPB-ALL TBT-treated cells was not affected by hypoosmotic shocks (130 mosM, 150 mosM and 175 mosM). As expected, in TBT-treated HPB45.0, the hyperosmotic shocks had no effects on DNA fragmentation. Interestingly, hypoosmotic shocks, which led to Cl^- efflux, a significant increase of nuclear apoptosis in HPB45.0 was noted (Figure 5). The increase in DNA fragmentation correlates with the decrease of NaCl in the medium. These data indicate a relationship between the lack of DNA fragmentation in the absence of CD45 expression, CLC activation and Cl^- efflux.

Discussion

In the last decade, numerous progresses have been done to understand apoptotic pathways. However, several reports show the absence of nuclear apoptosis despite DFF40/DFF45 cleavage and activation of DFF40 (11-15). These results suggest a regulation of nuclear apoptosis downstream of caspase-3 activation. We expand our knowledge on nuclear apoptosis by demonstrating the importance of ionic homeostasis in nucleosomal fragmentation. Indeed, we showed that the loss of chloride channel regulation in CD45 deficient cell lines is associated with the loss of AVD and pH acidification, two processes required for DNA fragmentation.

The loss of volume and intracellular acidification are two hallmarks of apoptosis and are controlled by CIC (16). CIC-2 and CIC-3 have been reported to be sensitive to activation by cell swelling meanwhile CIC-2 and CIC-4 are involved in pH regulation (40). Our results show in CD45 deficient cell lines the absence of AVD and the perturbation of pH acidification (Fig. 2 and 3). The absence of tyrosine phosphorylation in CIC-2, -3, -4 suggest the loss of their activation in absence of CD45 molecules. The CIC are known to be regulated by members of Src family (24, 26). Among them, the p56^{lck} protein is well established to regulate CIC especially a swelling-induced chloride channel (23). On the other hand, CD45 is known to regulate two Src family members: the p56^{lck} and p59^{fyn} proteins (41,42). Thus, a relationship can be made between the regulation of these Src members and the role of these members on CIC regulation. We have demonstrated that in the absence of CD45 expression there is a decrease in tyrosine phosphorylation in TBT-

treated cell lysates. Importantly, in CD45 expressing cells, several proteins become tyrosine phosphorylated after triggering apoptosis by TBT exposure. The involvement of the tyrosine kinase pathway in apoptosis is well documented, but the identification of ionic channels as putative substrates involved in nuclear apoptosis is a first demonstration.

Regarding the results presented in this work, a key question is whether ionic channels play a predominant role in apoptosis? Apoptotic volume decrease represents an early event in apoptosis and is an early prerequisite to DNA fragmentation (32). Efflux of intracellular K⁺ and Cl⁻ promote activation of endonuclease and represent an important condition in the course of apoptosis (17, 35). Moreover, it has been proposed that Cl⁻ channel opening is linked to intracellular pH acidification leading to enhanced endonuclease activity (27). Interestingly, in ceramide induced apoptosis, an activation of p56^{lck} associated with a profound effect on ion channels was demonstrated, showing the importance of this event (42, 43). The p56^{lck} activity can positively regulate some ion channels like the outward rectifying chloride channel (23) or negatively as demonstrated for N-K⁺ channels (30). Thus diversity in the ion channel family and the involvement of their phosphorylation points out a fine mechanism of control for enzymatic activity involved in several steps of apoptosis. Regarding nuclear apoptosis, the control of ions fluxes in the cells, particularly at nucleus level, may be involved in the control of nuclear pores and thus in the control of DNAses mediating DNA fragmentation. Indeed, it can be hypothesized that the changes in ion homeostasis could reduce the access of the nuclease to the nucleus or the internucleosomal domains of DNA. Moreover, control of

intracellular pH can also influence endonuclease activity, particularly for DFF40 which enzymatic activity can be reduced in acidic conditions (14, 18).

The results showed in this study have demonstrated a new pathway for the induction of nuclear apoptosis by the expression of the CD45. In contrast to wild-type cells, CD45-deficient cells are resistant to nuclear apoptosis. In CD45⁻ cells, there is an ionic disruption with a lack of ClC activation. These channels control the ionic homeostasis possibly responsible for the activation and/or localization of the DFF40. The CD45 receptor is implicated in nuclear apoptosis by the regulation of Src members that regulated the activation of chloride channels.

Figure Legends

Figure 1 : HPB45.0 cell line deficient in CD45 have no nuclear apoptosis associated with tyrosine kinase activity. A) HPB-ALL (CD45+) or HPB45.0 (CD45-) were TBT-treated for 4 hrs with 0.8 μ M TBT and internucleosomal cleavage determined on agarose gel. Absence of CD45 expression is associated with inhibition of nuclear apoptosis. B) Inhibition of tyrosine kinase activity in HPB-ALL results in the inhibition of DNA fragmentation. Panel at right represent the control of tyrosine kinase inhibition by genistein. C) TBT-treatment of HPB-ALL, but not for HPB45.0 induced an increase of tyrosine phosphorylation in cell lysates. +: Indicates the positive control (PHA stimulation for 2 min).

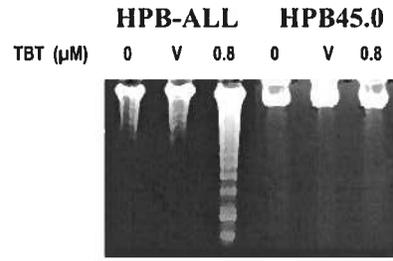
Figure 2 : AVD is decreased in cells that has loss CD45 expression. HPB-ALL or HPB45.0 were exposed to 0.8 μ M of TBT for 240 min and cell volumes were analyzed by flow cytometry. A) Representative FACS analysis for cell volume decrease. B) Mean obtained from three independent experiments for % of cells with a reduced volume, (n=3 for 3 experiments, *= p< 0.05)

Figure 3 : Impairment of intracellular acidification and phosphatidylserin flipping in apoptotic CD45- cell line. Cells were exposed to 0.8 μ M of TBT for 240 min before being stained with probe BCECF-AM or with FITC-annexin V. A) Intracellular pH and B) PS flipping analyzed by flow cytometry. Experiment was performed in triplicates to confirm the results.

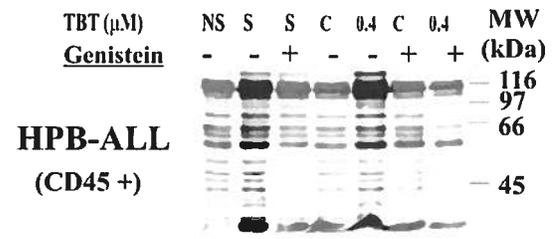
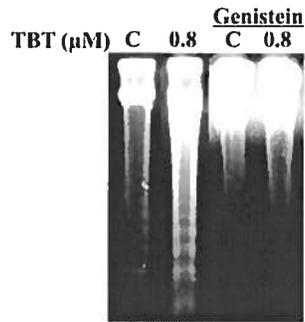
Figure 4 : Absence of activation of CIC by their phosphorylation on tyrosine residues in CD45– cell line. A) Cells were lysed and CIC were immunoprecipated using an anti-CIC-2, anti-CIC-3 or anti-CIC-4 antibody. Proteins were loaded on a 7.5 % SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-CIC-2, anti-CIC-3 or anti-CIC-4 antibody. B) Cells were exposed to 0.8 μ M of TBT for 240 min., lysed and CIC-2, CIC-3 and CIC-4 immunoprecipated with specific antibody. Phosphotyrosine increases were assested by immunoblotting with an anti-phostyrosine antibody.

Figure 5 : Hyperosmotic shock inhibits DNA fragmentation in apoptotic CD45+ cell line and hypoosmotic shock induces DNA fragmentation in apoptotic CD45– cell line. Cells were exposed to 0.8 μ M of TBT for 240 min. Deionized water or NaCl was added to the culture medium 120 min after TBT-treatment. DNA fragmentation was analyzed by flow cytometer after staining with Krishan buffer (n=3, p< 0.05).

A



B



C

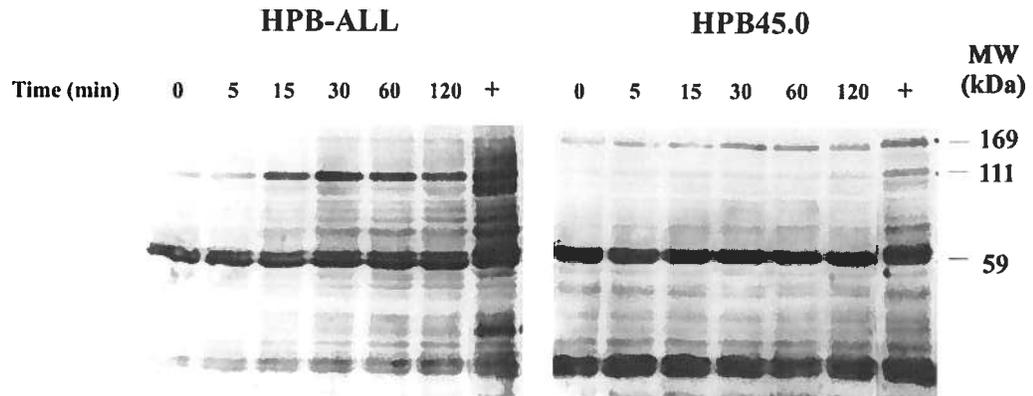


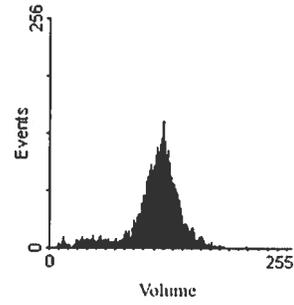
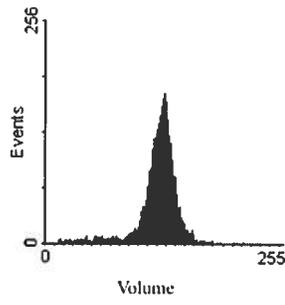
Figure 1

A

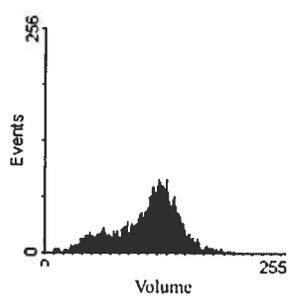
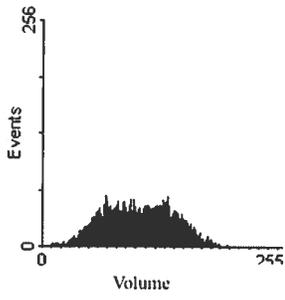
HPB-ALL

HPB45.0

C



TBT



B

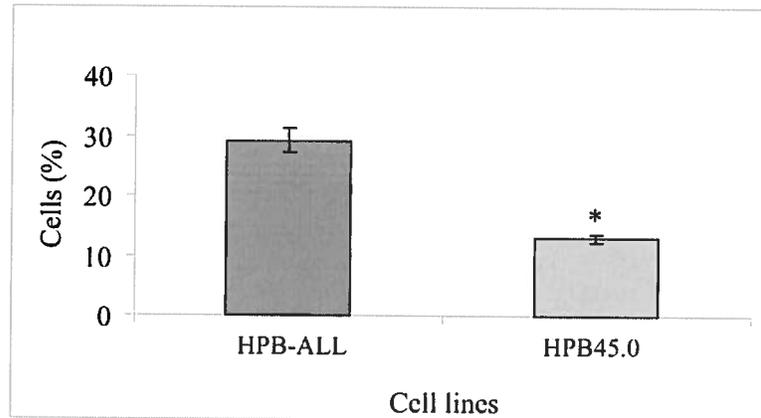


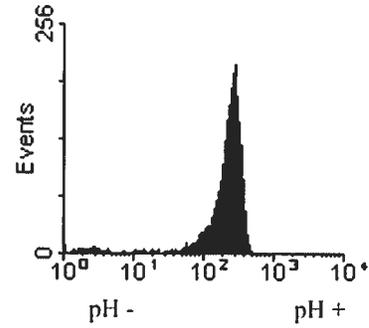
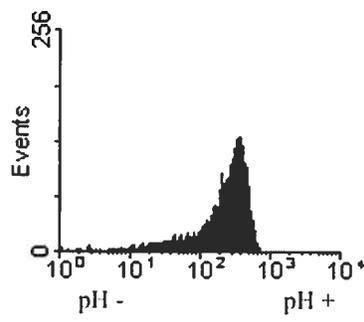
Figure 2

A

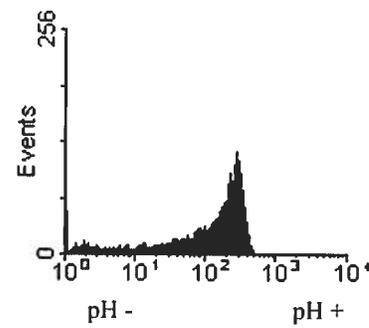
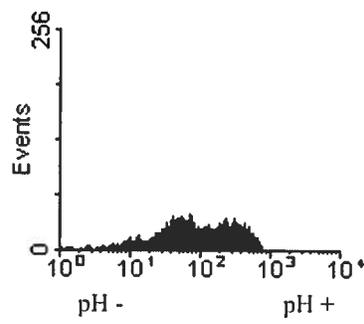
HPB-ALL

HPB45.0

C



TBT



B

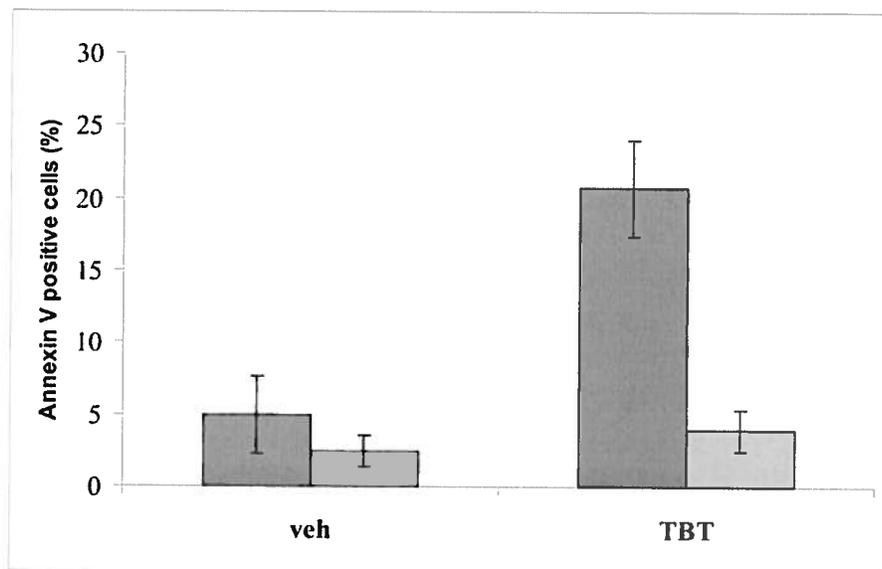
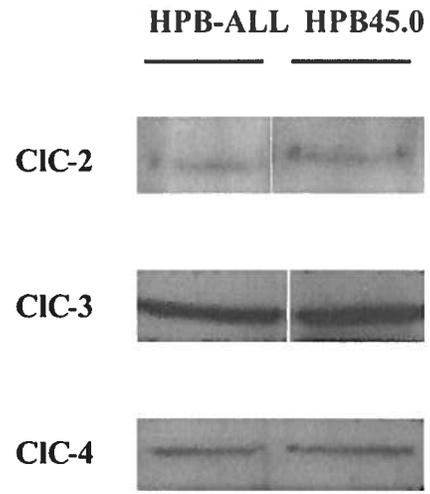


Figure 3

A



B

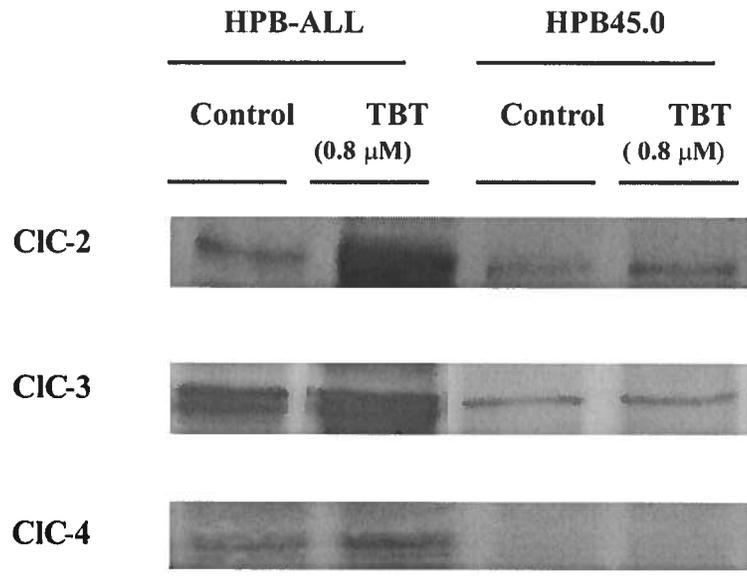


Figure 4

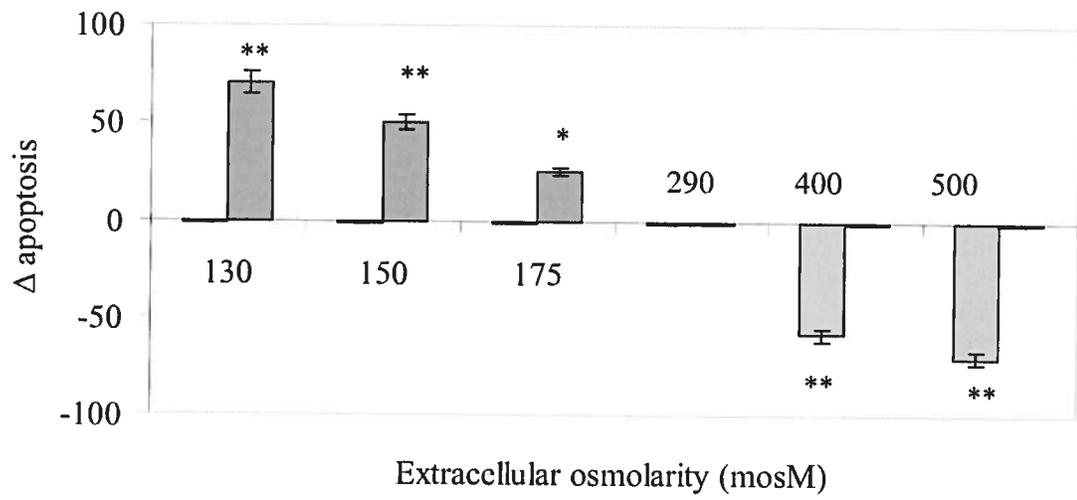


Figure 5

References

1. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; **267**: 1456-62.
2. Townson JL, Naumov GN, Chambers AF. The role of apoptosis in tumor progression and metastasis. *Curr Mol Med* 2003; **3**: 631-42.
3. Lawen A. Apoptosis-an introduction. *Bioessays* 2003; **25**: 888-96.
4. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; **326** (Pt 1): 1-16.
5. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; **281**: 1309-12.
6. Wallace KB, Eells JT, Madeira VM, Cortopassi G, Jones DP. Mitochondria-mediated cell injury. Symposium overview. *Fundam Appl Toxicol* 1997; **38**: 23-37.
7. Mukae N, Enari M, Sakahira H *et al.* Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 9123-8.
8. Hsieh SY, Liaw SF, Lee SN *et al.* Aberrant caspase-activated DNase (CAD) transcripts in human hepatoma cells. *Br J Cancer* 2003; **88**: 210-6.
9. Samejima K, Tone S, Earnshaw WC. CAD/DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J Biol Chem* 2001; **276**: 45427-32.

10. Liu X, Li P, Widlak P *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**: 8461-6.
11. Rasola A, Farahi Far D, Hofman P, Rossi B. Lack of internucleosomal DNA fragmentation is related to Cl(-) efflux impairment in hematopoietic cell apoptosis. *FASEB J* 1999; **13**: 1711-23.
12. Kawane K, Fukuyama H, Yoshida H *et al.* Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. *Nat Immunol* 2003; **4**: 138-44.
13. Zhang M, Li Y, Zhang H, Xue S. BAPTA blocks DNA fragmentation and chromatin condensation downstream of caspase-3 and DFF activation in HT-induced apoptosis in HL-60 cells. *Apoptosis* 2001; **6**: 291-7.
14. Iguchi K, Usui S, Ishida R, Hirano K. Imidazole-induced cell death, associated with intracellular acidification, caspase-3 activation, DFF-45 cleavage, but not oligonucleosomal DNA fragmentation. *Apoptosis* 2002; **7**: 519-25.
15. Iguchi K, Hirano K, Ishida R. Activation of caspase-3, proteolytic cleavage of DFF and no oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic Molt-4 cells. *J Biochem (Tokyo)* 2002; **131**: 469-75.
16. Okada Y, Maeno E. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; **130**: 377-83.

17. Yu SP, Choi DW. Ions, cell volume, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 9360-2.
18. Widlak P, Garrard WT. Ionic and cofactor requirements for the activity of the apoptotic endonuclease DFF40/CAD. *Mol Cell Biochem* 2001; **218**: 125-30.
19. Lesage S, Steff AM, Philippoussis F *et al.* CD4+ CD8+ thymocytes are preferentially induced to die following CD45 cross-linking, through a novel apoptotic pathway. *J Immunol* 1997; **159**: 4762-71.
20. Klaus SJ, Sidorenko SP, Clark EA. CD45 ligation induces programmed cell death in T and B lymphocytes. *J Immunol* 1996; **156**: 2743-53.
21. Thomas ML, Brown EJ. Positive and negative regulation of Src-family membrane kinases by CD45. *Immunol Today* 1999; **20**: 406-11.
22. Alexander DR. The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. *Semin Immunol* 2000; **12**: 349-59.
23. Lepple-Wienhues A, Szabo I, Laun T, Kaba NK, Gulbins E, Lang F. The tyrosine kinase p56lck mediates activation of swelling-induced chloride channels in lymphocytes. *J Cell Biol* 1998; **141**: 281-6.
24. Edwards JC, Kapadia S. Regulation of the bovine kidney microsomal chloride channel p64 by p59fyn, a Src family tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2000; **275**: 31826-32.

25. Shi C, Barnes S, Coca-Prados M, Kelly ME. Protein tyrosine kinase and protein phosphatase signaling pathways regulate volume-sensitive chloride currents in a nonpigmented ciliary epithelial cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; **43**: 1525-32.
26. Lepple-Wienhues A, Szabo I, Wieland U, Heil L, Gulbins E, Lang F. Tyrosine kinases open lymphocyte chloride channels. *Cell Physiol Biochem* 2000; **10**: 307-12.
27. Szabo I, Lepple-Wienhues A, Kaba KN, Zoratti M, Gulbins E, Lang F. Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 6169-74.
28. Lepple-Wienhues A, Wieland U, Laun T, Heil L, Stern M, Lang F. A src-like kinase activates outwardly rectifying chloride channels in CFTR-defective lymphocytes. *FASEB J* 2001; **15**: 927-31.
29. Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2000; **2**: 318-25.
30. Gulbins E, Jekle A, Ferlinz K, Grassme H, Lang F. Physiology of apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; **279**: F605-15.
31. Wesselborg S, Kabelitz D. Activation-driven death of human T cell clones: time course kinetics of the induction of cell shrinkage, DNA fragmentation, and cell death. *Cell Immunol* 1993; **148**: 234-41.

32. Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 9487-92.
33. Stout JG, Basse F, Luhm RA, Weiss HJ, Wiedmer T, Sims PJ. Scott syndrome erythrocytes contain a membrane protein capable of mediating Ca²⁺-dependent transbilayer migration of membrane phospholipids. *J Clin Invest* 1997; **99**: 2232-8.
34. Meisenholder GW, Martin SJ, Green DR, Nordberg J, Babior BM, Gottlieb RA. Events in apoptosis. Acidification is downstream of protease activation and BCL-2 protection. *J Biol Chem* 1996; **271**: 16260-2.
35. Barros LF, Castro J, Bittner CX. Ion movements in cell death: from protection to execution. *Biol Res* 2002; **35**: 209-14.
36. Nilius B, Droogmans G. Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand* 2003; **177**: 119-47.
37. Jiang B, Hattori N, Liu B, Kitagawa K, Inagaki C. Expression of swelling- and/or pH-regulated chloride channels (ClC-2, 3, 4 and 5) in human leukemic and normal immune cells. *Life Sci* 2002; **70**: 1383-94.
38. Fahlke C. Ion permeation and selectivity in ClC-type chloride channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **280**: F748-57.

39. Friedrich T, Breiderhoff T, Jentsch TJ. Mutational analysis demonstrates that CIC-4 and CIC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem* 1999; **274**: 896-902.
40. Mustelin T, Pessa-Morikawa T, Autero M *et al.* Regulation of the p59fyn protein tyrosine kinase by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Eur J Immunol* 1992; **22**: 1173-8.
41. Burns CM, Sakaguchi K, Appella E, Ashwell JD. CD45 regulation of tyrosine phosphorylation and enzyme activity of src family kinases. *J Biol Chem* 1994; **269**: 13594-600.
42. Lang F, Szabo I, Lepple-Wienhues A, Siemen D, Gulbins E. Physiology of Receptor-Mediated Lymphocyte Apoptosis. *News Physiol Sci* 1999; **14**: 194-200.
43. Gulbins E, Szabo I, Baltzer K, Lang F. Ceramide-induced inhibition of T lymphocyte voltage-gated potassium channel is mediated by tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 7661-6.

Conclusion

Dans les dernières années, plusieurs études ont été réalisées pour comprendre la voie de signalisation impliquée dans l'apoptose. Notre laboratoire a démontré antérieurement une implication du CD45 dans ce processus de mort cellulaire. En effet, l'expression du CD45 est essentielle à la fragmentation internucléosomale de l'ADN et à la condensation de la chromatine, deux événements caractéristiques à l'apoptose. De plus, suite à cette induction de l'apoptose par l'exposition à des agents chimiques, les cellules CD45⁺ et CD45⁻ démontrent une mobilisation du calcium intracellulaire, une dégradation d'I κ B- α , une réduction du potentiel membranaire mitochondrial, le relâchement du cytochrome c de la mitochondrie, l'activation de la caspase-3 et le clivage du DFF45. Ces résultats ont démontré pour la première fois une implication du CD45 dans l'apoptose nucléaire par la voie de la mitochondrie. La résistance à l'apoptose nucléaire chez les cellules CD45⁻ se produit avec plusieurs agents chimiques qui induisent l'apoptose par la voie de la mitochondrie, dont le TBT, le peroxyde d'hydrogène et certaines drogues de chimiothérapies.

En continuité avec nos travaux antérieurs, cette présente étude démontre le rôle du CD45 dans l'apoptose nucléaire par une régulation de l'homéostasie ionique. Durant cette étude, les connaissances sur l'apoptose nucléaire sont approfondies en démontrant l'importance de l'homéostasie ionique dans la fragmentation nucléosomale de l'ADN. En effet, nous avons montré que la perte de la régulation des canaux de chlore chez des cellules déficientes pour l'expression du CD45 est associée à une perte de la réduction du volume cellulaire et de l'acidification intracellulaire, deux processus requis pour la fragmentation de l'ADN. Associés à ces changements, nous avons démontré qu'en absence du CD45 il y a présence d'un défaut d'activation des canaux de chlore et une perturbation de la translocation du DFF40 dans le noyau.

Premièrement, puisque le CD45 régule deux tyrosines kinases de la famille Src, les protéines p56^{lck} et p59^{lyn}, nous avons évalué l'importance de la voie de signalisation de la phosphorylation de tyrosines sur l'apoptose nucléaire. L'ajout d'un inhibiteur de

tyrosines kinases aux cellules CD45+ suite à l'induction de l'apoptose inhibe complètement la fragmentation internucléosomale de l'ADN (Figure 1A de l'article). De plus, après l'évaluation de la phosphorylation des tyrosines suite à l'induction de l'apoptose, une augmentation de la phosphorylation est observée chez les cellules CD45+ (Figure 1C de l'article). Par contre, l'absence de CD45 résulte à une hyperphosphorylation de ces substrats sans modulation de l'état de phosphorylation.

La voie des tyrosines kinases représente un événement précoce dans l'activation des cellules T et dans l'apoptose. L'activation de tyrosines kinases joue un rôle majeur lors de la régulation du volume cellulaire (Gulbins *et al.*, 2000). Le processus AVD est un événement précoce de l'apoptose se produisant avant plusieurs événements biochimiques (Wesselborg et Kabelitz, 1993). De plus, le processus AVD précède la fragmentation de l'ADN et seulement les cellules ayant diminué de volume démontrent une fragmentation de l'ADN (Maeno *et al.*, 2000). Nous avons donc déterminé si l'expression du CD45 est nécessaire pour la diminution du volume cellulaire lors de l'apoptose. En effet, peu de cellules CD45- présentent une diminution du volume cellulaire (Figure 2A et 2B de l'article). Conséquemment, une relation existe entre l'expression du CD45, l'activité tyrosine kinase et le contrôle du processus AVD.

L'acidification intracellulaire et l'externalisation des résidus phosphatidylsérine sont deux modifications biochimiques caractéristiques à l'apoptose. Chez les cellules apoptotiques ces deux événements sont reliés (Meisenholder *et al.*, 1996; Stout *et al.*, 1997). Puisque nous avons observé une perturbation dans le processus AVD, nous avons donc évalué la nécessité du CD45 dans l'acidification intracellulaire. Après l'exposition au TBT, l'absence de l'expression du CD45 est associée à la perte de l'acidification intracellulaire (Figure 3A de l'article). Puisque l'acidification intracellulaire est requise pour l'externalisation des résidus phosphatidylsérine (Meisenholder *et al.*, 1996), nous avons évalué l'externalisation de ces derniers pour confirmer l'absence de l'acidification. Nos résultats démontrent l'absence de l'acidification intracellulaire chez les cellules CD45- correspondant avec la perte de l'externalisation des résidus phosphatidylsérine

(Figure 3B de l'article). Nos résultats suggèrent donc une perturbation de l'homéostasie ionique lors de l'absence du CD45.

Les canaux de chlore participent au processus AVD, à l'acidification du pH et à la fragmentation de l'ADN (Barros, Castro et Bittner, 2002). Nous avons déterminé l'expression de trois canaux de chlore impliqués dans l'homéostasie ionique des cellules : CIC-2, CIC-3 et CIC-4. Chez les cellules CD45+ et CD45-, les niveaux d'expression de ces canaux sont semblables (Figure 4A de l'article). La phosphorylation des résidus tyrosine des canaux de chlore mène à leur activation et à l'échange d'ions de chlore (Lepple-Wienhues *et al.*, 2000; Lepple-Wienhues *et al.*, 2001; Szabo *et al.*, 1998). Conséquemment, une modification de leur phosphorylation peut être reliée à des changements dans l'homéostasie ionique lors de l'apoptose. Nous avons donc évalué l'influence de l'expression du CD45 sur la phosphorylation des canaux de chlore durant l'apoptose. Après l'exposition au TBT, une augmentation de la phosphorylation est observée chez les cellules CD45+ tandis qu'aucun changement n'est observé chez les cellules CD45- (Figure 4B de l'article). Nos résultats suggèrent que la phosphorylation des résidus tyrosine des canaux de chlore soit sous le contrôle de tyrosines kinases, régulées par le CD45.

Puisque l'inhibition des efflux de chlore inhibe la fragmentation de l'ADN (Kawane *et al.*, 2003), nous avons analysé si l'induction d'un efflux de chlore peut induire une fragmentation de l'ADN chez les cellules CD45-. Après l'exposition à un choc hypertonique, inhibant la sortie des ions de chlore, les cellules CD45+ démontrent une diminution de la fragmentation de l'ADN. De plus, l'exposition des cellules CD45- à un milieu hypotonique, favorisant la sortie des ions de chlore, induit partiellement une fragmentation de l'ADN chez ces cellules (Figure 5 de l'article). Ces résultats indiquent une relation entre l'absence de la fragmentation de l'ADN, l'activation des canaux de chlore et les efflux de chlore lors de l'absence de l'expression du CD45.

L'endonucléase DFF40 est la principale enzyme responsable de la fragmentation de l'ADN. Il est connu que son activation est dépendante des changements ioniques

intracellulaires (Widlak et Garrard, 2001). Puisque la localisation du DFF45 et du DFF40 sont controversées, nous avons déterminé leurs localisations chez les cellules T pour vérifier la perturbation de l'activité du DFF40. Nos résultats démontrent que le DFF45 est retrouvé dans le cytoplasme des cellules CD45+ et CD45- au contrôle, puis il est clivé suite à l'ajout de TBT (Figure 7A). Chez les cellules CD45+, le DFF40 est retrouvé dans le cytoplasme au contrôle, puis il migre progressivement vers le noyau à l'ajout de TBT (Figure 7B). Par contre, le DFF40 est retrouvé seulement dans le cytoplasme des cellules CD45-, même suite à l'exposition au TBT. Ces résultats démontrent qu'en absence du CD45 le DFF45 est clivé, mais la migration du DFF40 vers le noyau est perturbée.

La diminution du volume cellulaire et l'acidification intracellulaire sont deux événements caractéristiques à l'apoptose et sont contrôlées par les canaux de chlore (Okada *et al.*, 2001). Les canaux de chlore CIC-2 et CIC-3 ont été reportés comme étant sensibles au gonflement cellulaire tandis que CIC-2 et CIC-4 sont impliqués dans la régulation du pH (Jiang *et al.*, 2002). Nos résultats montrent une absence du processus AVD et une perturbation de l'acidification intracellulaire chez les cellules CD45-. Ces résultats indiquent une perturbation de l'homéostasie ionique en absence du récepteur CD45. Puisque l'homéostasie ionique des cellules est régulée, entre autres, par les canaux de chlore, nous avons vérifié le niveau d'activation de ces canaux. L'absence de la phosphorylation des résidus tyrosine des canaux CIC-2, CIC-3 et CIC-4 suggèrent une perturbation de leur activation en absence de la molécule CD45. Il est connu que les canaux de chlore sont régulés par des membres de la famille Src. Parmi ces membres, la tyrosine kinase p56^{lck} est bien connue pour son rôle dans la régulation des canaux de chlore sensibles au volume cellulaire (Lepple-Wienhues *et al.*, 2000). D'un autre côté, le CD45 est connu pour la régulation de deux membres de la famille Src, les tyrosines kinases p56^{lck} et p59^{fyn} (Thomas et Brugge, 1997). Donc, une relation peut être établie entre la régulation de ces membres de la famille Src et le rôle de ces protéines sur la régulation des canaux de chlore. Nous avons démontré qu'en absence de l'expression du CD45, il n'y a pas d'augmentation de la phosphorylation des résidus tyrosine des canaux de chlore. Lors de la présence du CD45, plusieurs protéines deviennent phosphorylées après l'induction de l'apoptose par une exposition au TBT. L'implication de la voie des

tyrosines kinases dans l'apoptose est bien documentée, mais l'identification de canaux de chlore comme substrats impliqués dans l'apoptose nucléaire représente la première démonstration.

En examinant les résultats obtenus au cours de ces travaux, une question peut être posée : Est-ce que les canaux de chlore jouent un rôle prédominant dans l'apoptose ? La diminution de volume cellulaire lors de l'apoptose est un événement précoce et un prérequis pour la fragmentation de l'ADN (Maeno *et al.*, 2000). L'efflux de K⁺ et de Cl⁻ stimulent l'activation d'endonucléases et représentent des conditions importantes au cours de l'apoptose (Barros, Castro et Bittner, 2002; Yu et Choi, 2000). De plus, il a été proposé que l'ouverture des canaux de chlore est reliée à l'acidification intracellulaire menant à l'augmentation de l'activité des endonucléases (Szabo *et al.*, 1998). Il a été démontré que l'apoptose induite par la céramide démontre une activation de la p56^{lck} associée avec un effet important sur les canaux de chlore, démontrant l'importance de cet événement (Gulbins *et al.*, 1997). L'activité de la p56^{lck} peut réguler positivement certains canaux de chlore comme les ORCC ou négativement comme démontré pour les canaux N-K⁺ (Gulbins *et al.*, 2000). Donc, la phosphorylation des canaux ioniques peut être un mécanisme de contrôle par l'activité enzymatique impliquée dans plusieurs étapes de l'apoptose.

Le DFF40 est la principale nucléase responsable de la fragmentation de l'ADN durant l'apoptose. Des études avec des clones purifiés de l'enzyme CAD, ont démontré que la seule présence de CAD est suffisante pour induire la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine chez des noyaux isolés (Samejima, Tone et Earnshaw, 2001). De plus, des travaux sur des thymocytes de souris déficientes pour l'expression de CAD ont démontré que ces thymocytes ne possèdent pas de fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose (Kawane *et al.*, 2003). Le contrôle des flux d'ions, plus particulièrement au niveau du noyau, peut être impliqué dans la régulation des endonucléases impliquées dans la fragmentation de l'ADN. En effet, une hypothèse est que des changements dans l'homéostasie des ions peuvent réduire l'accès des nucléases au noyau ou aux domaines internucléosomales de l'ADN. De plus, le contrôle du pH intracellulaire peut influencer

l'activité des endonucléases particulièrement l'activation du DFF40 qui est diminuée en condition acide (Widlak et Garrard, 2001). Plusieurs études ont démontré une absence de l'apoptose nucléaire malgré le clivage du DFF45 et de l'activation du DFF40 (Iguchi *et al.*, 2002 ; Kawane *et al.*, 2003 ; Rasola *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent une régulation de l'apoptose nucléaire en aval de l'activation de la caspase-3. Nos résultats démontrent un clivage du DFF45 chez les deux types cellulaires. Ces résultats indiquent que l'absence de fragmentation de l'ADN chez les CD45- se produit en aval du clivage du DFF45. Le complexe DFF45/DFF40 a originalement été localisé dans le cytoplasme (Sakahira, Enari et Nagata, 1998). Il a également été postulé que le clivage du DFF45 par la caspase-3 se produit dans le cytosol et que le DFF40 est transloqué dans le noyau après son relâchement (Mitamura *et al.*, 1998). Il a ensuite été démontré que le DFF45 ainsi que le DFF40 sont localisés au niveau du noyau dans plusieurs types cellulaires (Liu *et al.*, 1997; Samejima et Earnshaw, 1998; Samejima, Tone et Earnshaw, 2001). La localisation du complexe pourrait donc varier selon le type cellulaire. Dans notre étude, nous avons démontré que le complexe est localisé dans le cytoplasme de lymphocytes T et suite au clivage du DFF45, le DFF40 est transloqué vers le noyau. En plus d'un défaut de l'activité du DFF40, nos résultats démontrent une absence du DFF40 dans le noyau des cellules CD45-.

Nos résultats obtenus dans cette étude démontrent une nouvelle voie de signalisation dans l'induction de l'apoptose nucléaire par l'expression du CD45. Contrairement aux cellules CD45+, les cellules déficientes pour l'expression du CD45 sont résistantes à l'apoptose nucléaire. Chez les cellules CD45-, il y a une perturbation ionique avec un défaut d'activation des canaux de chlore. Tandis que le DFF45 est clivé, il y a une perturbation de la translocation du DFF40 dans le noyau des cellules CD45-. Les canaux de chlore contrôlent l'homéostasie ionique responsable de l'activation et de la localisation du DFF40. Le récepteur CD45 est donc impliqué dans l'apoptose nucléaire par la régulation des membres de la famille Src qui régulent l'activation des canaux de chlore.

Des travaux futurs seront nécessaires pour déterminer l'implication des différents domaines ectoplasmiques et cytoplasmiques du CD45 dans la régulation de l'apoptose nucléaire. De plus, il serait intéressant de déterminer les différentes protéines tyrosines kinases impliquées dans la régulation des canaux de chlore chez les lymphocytes T. Ce projet de recherche nous permettra d'identifier les causes de résistances de certaines tumeurs au traitement de chimiothérapie. En effet, les cellules leucémiques résistantes au processus de l'apoptose ont perdu l'expression du CD45.

ANNEXE

Travaux non inclus dans l'article

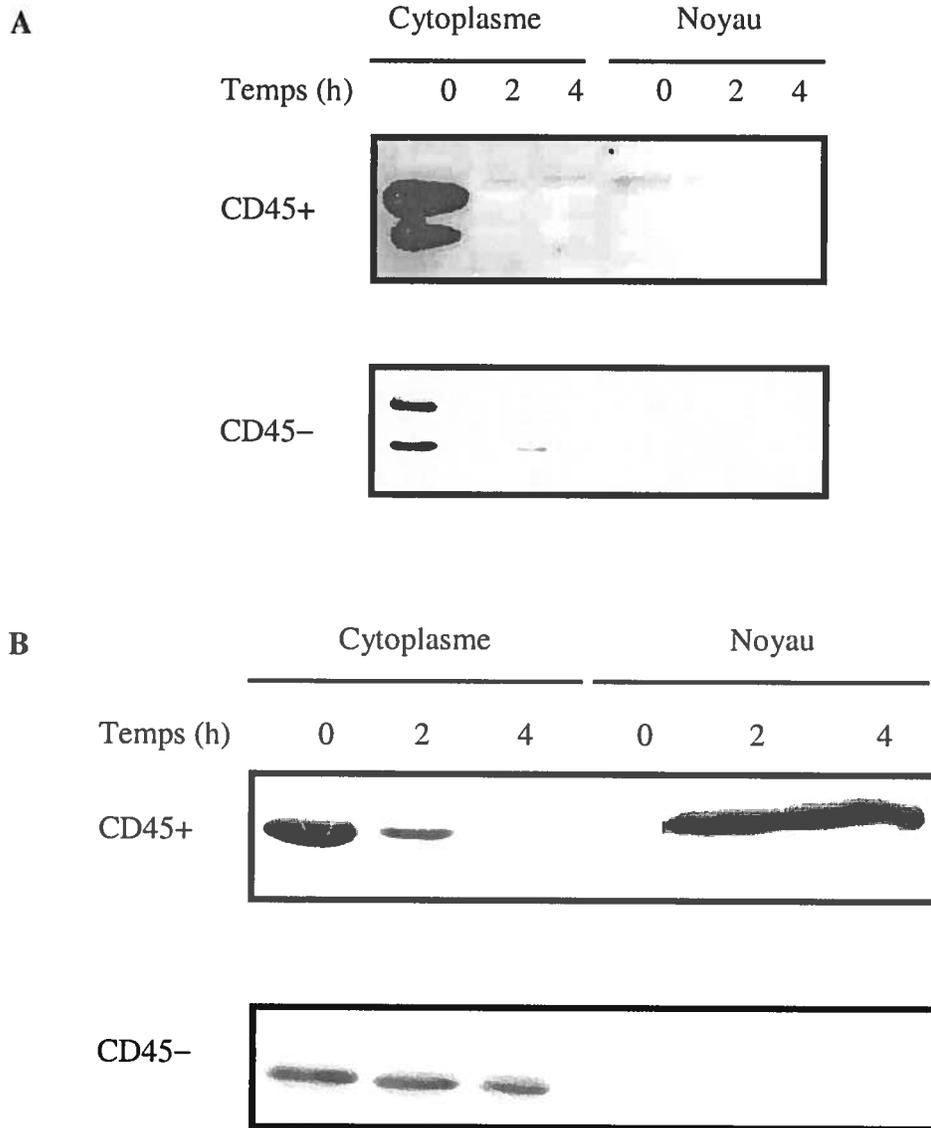


Figure 7 : Détermination du clivage du DFF45 ainsi que de la localisation intracellulaire du DFF40 et du DFF45 lors de l'induction de l'apoptose par le TBT. Les cellules ont été exposées à 0.8 μM de TBT pendant 120 ou 240 minutes, puis les fractions cytosoliques et nucléaires ont été séparées. Les différentes fractions protéiniques ont été migrées sur un gel SDS-PAGE (12 %). Les protéines ont été détectées par immunobuvardage de type western avec un anticorps anti-DFF45 ou anti-DFF40. A) Le DFF45 se retrouve dans le cytoplasme et est clivé chez les deux lignées cellulaires, CD45+ et CD45-. B) La translocation du DFF40 dans le noyau est perturbée chez la lignée cellulaire CD45-.

Liste des références

- ADAMS, J. M. and S. Cory. 2001. «Life-or-Death Decisions by the Bcl-2 Protein Family». Trends Biochem Sci, vol. 26, no. 1, p. 61-6.
- AHMED, N., M. Ramjeesingh, S. Wong, A. Varga, E. Garami, and C. E. Bear. 2000. «Chloride Channel Activity of ClC-2 Is Modified by the Actin Cytoskeleton». Biochem J, vol. 352 Pt 3, p. 789-94.
- ALEXANDER, D. R. 2000. «The CD45 Tyrosine Phosphatase: a Positive and Negative Regulator of Immune Cell Function». Semin Immunol, vol. 12, no. 4, p. 349-59.
- ALGECIRAS-SCHIMNICH, A., L. Shen, B. C. Barnhart, A. E. Murmann, J. K. Burkhardt, and M. E. Peter. 2002. «Molecular Ordering of the Initial Signaling Events of CD95». Mol Cell Biol, vol. 22, no. 1, p. 207-20.
- ARENDT, C. W. and H. L. Ostergaard. 1997. «Identification of the CD45-Associated 116-KDa and 80-KDa Proteins As the Alpha- and Beta-Subunits of Alpha-Glucosidase II». J Biol Chem, vol. 272, no. 20, p. 13117-25.
- AROLD, S. T., T. S. Ulmer, T. D. Mulhern, J. M. Werner, J. E. Ladbury, I. D. Campbell, and M. E. Noble. 2001. «The Role of the Src Homology 3-Src Homology 2 Interface in the Regulation of Src Kinases». J Biol Chem, vol. 276, no. 20, p. 17199-205.
- ASHE, P. C. and M. D. Berry. 2003. «Apoptotic Signaling Cascades». Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, vol. 27, no. 2, p. 199-214.
- ASHKENAZI, A. and V. M. Dixit. 1998. «Death Receptors: Signaling and Modulation». Science, vol. 281, no. 5381, p. 1305-8.
- BAKER, M., J. Gamble, R. Tooze, D. Higgins, F. T. Yang, P. C. O'Brien, N. Coleman, S. Pingel, M. Turner, and D. R. Alexander. 2000. «Development of T-Leukaemias in CD45 Tyrosine Phosphatase-Deficient Mutant Lck Mice». EMBO J, vol. 19, no. 17, p. 4644-54.
- BALDWIN, T. A., M. Gogela-Spehar, and H. L. Ostergaard. 2000. «Specific Isoforms of the Resident Endoplasmic Reticulum Protein Glucosidase II Associate With the CD45 Protein-Tyrosine Phosphatase Via a Lectin-Like Interaction». J Biol Chem, vol. 275, no. 41, p. 32071-6.
- BARROS, L. F., J. Castro et C. X. Bittner. 2002. "Ion movements in cell death: from protection to execution". Biological Research, vol. 35, p. 209-14.
- BERGMANN, A., J. Agapite, and H. Steller. 1998. «Mechanisms and Control of Programmed Cell Death in Invertebrates». Oncogene, vol. 17, no. 25, p. 3215-23.
- BETZ, H. 1990. «Ligand-Gated Ion Channels in the Brain: the Amino Acid Receptor Superfamily». Neuron, vol. 5, no. 4, p. 383-92.

- BILLADEAU, D. D. and P. J. Leibson. 2002. «ITAMs Versus ITIMs: Striking a Balance During Cell Regulation». J Clin Invest, vol. 109, no. 2, p. 161-8.
- BLEESING, J. J., M. R. Morrow, G. Uzel, and T. A. Fleisher. 2001. «Human T Cell Activation Induces the Expression of a Novel CD45 Isoform That Is Analogous to Murine B220 and Is Associated With Altered O-Glycan Synthesis and Onset of Apoptosis». Cell Immunol, vol. 213, no. 1, p. 72-81.
- BORNER, C. 2003. «The Bcl-2 Protein Family: Sensors and Checkpoints for Life-or-Death Decisions». Mol Immunol, vol. 39, no. 11, p. 615-47.
- BORTNER, C. D. and J. A. Cidlowski. 1999. «Caspase Independent/Dependent Regulation of K(+), Cell Shrinkage, and Mitochondrial Membrane Potential During Lymphocyte Apoptosis». J Biol Chem, vol. 274, no. 31, p. 21953-62.
- BRITTON, F. C., W. J. Hatton, C. F. Rossow, D. Duan, J. R. Hume, and B. Horowitz. 2000. «Molecular Distribution of Volume-Regulated Chloride Channels (ClC-2 and ClC-3) in Cardiac Tissues». Am J Physiol Heart Circ Physiol, vol. 279, no. 5, p. H2225-33.
- BROOKS, W. P. and M. A. Lynes. 2001. «Effects of Hemizygous CD45 Expression in the Autoimmune FasI(Gld/Gld) Syndrome». Cell Immunol, vol. 212, no. 1, p. 24-34.
- BUBIEN, J. K. 2001. «CFTR May Play a Role in Regulated Secretion by Lymphocytes: a New Hypothesis for the Pathophysiology of Cystic Fibrosis». Pflugers Arch, vol. 443 Suppl 1, p. S36-9.
- BYTH, K. F., L. A. Conroy, S. Howlett, A. J. Smith, J. May, D. R. Alexander, and N. Holmes. 1996. «CD45-Null Transgenic Mice Reveal a Positive Regulatory Role for CD45 in Early Thymocyte Development, in the Selection of CD4+CD8+ Thymocytes, and B Cell Maturation». J Exp Med, vol. 183, no. 4, p. 1707-18.
- CAHALAN, M. D., H. Wulff, and K. G. Chandy. 2001. «Molecular Properties and Physiological Roles of Ion Channels in the Immune System». J Clin Immunol, vol. 21, no. 4, p. 235-52.
- CAIN, K., S. B. Bratton, and G. M. Cohen. 2002. «The Apaf-1 Apoptosome: a Large Caspase-Activating Complex». Biochimie, vol. 84, no. 2-3, p. 203-14.
- CALE, C. M., N. J. Klein, V. Novelli, P. Veys, A. M. Jones, and G. Morgan. 1997. «Severe Combined Immunodeficiency With Abnormalities in Expression of the Common Leucocyte Antigen, CD45». Arch Dis Child, vol. 76, no. 2, p. 163-4.
- CARDONE, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, and J. C. Reed. 1998. «Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 by Phosphorylation». Science, vol. 282, no. 5392, p. 1318-21.
- CHANG, H. Y. and X. Yang. 2000. «Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases». Microbiol Mol Biol Rev, vol. 64, no. 4, p. 821-46.

- CHANG, S. H., P. C. Phelps, I. K. Berezesky, M. L. Ebersberger Jr, and B. F. Trump. 2000. «Studies on the Mechanisms and Kinetics of Apoptosis Induced by Microinjection of Cytochrome c in Rat Kidney Tubule Epithelial Cells (NRK-52E)». Am J Pathol, vol. 156, no. 2, p. 637-49.
- CHEN, D., R. A. Stetler, G. Cao, W. Pei, C. O'Horo, X. M. Yin, and J. Chen. 2000. «Characterization of the Rat DNA Fragmentation Factor 35/Inhibitor of Caspase-Activated DNase (Short Form). The Endogenous Inhibitor of Caspase-Dependent DNA Fragmentation in Neuronal Apoptosis». J Biol Chem, vol. 275, no. 49, p. 38508-17.
- COHEN, G. M. 1997. «Caspases: the Executioners of Apoptosis». Biochem J, vol. 326 (Pt 1), p. 1-16.
- COHEN, J. J. 1993. «Apoptosis: the Physiologic Pathway of Cell Death». Hosp Pract (Off Ed), vol. 28, no. 12, p. 35-43.
- COHEN, P. L. and R. A. Eisenberg. 1991. «Lpr and Gld: Single Gene Models of Systemic Autoimmunity and Lymphoproliferative Disease». Annu Rev Immunol, vol. 9, p. 243-69.
- COULTAS, L. and A. Strasser. 2003. «The Role of the Bcl-2 Protein Family in Cancer». Semin Cancer Biol, vol. 13, no. 2, p. 115-23.
- COUNIS, M. F. and A. Torriglia. 2000. «DNases and Apoptosis». Biochem Cell Biol, vol. 78, no. 4, p. 405-14.
- CREPEL, V., W. Panenka, M. E. Kelly, and B. A. MacVicar. 1998. «Mitogen-Activated Protein and Tyrosine Kinases in the Activation of Astrocyte Volume-Activated Chloride Current». J Neurosci, vol. 18, no. 4, p. 1196-206.
- D'SA-EIPPER, C., J. R. Leonard, G. Putcha, T. S. Zheng, R. A. Flavell, P. Rakic, K. Kuida, and K. A. Roth. 2001. «DNA Damage-Induced Neural Precursor Cell Apoptosis Requires P53 and Caspase 9 but Neither Bax nor Caspase 3». Development, vol. 128, no. 1, p. 137-46.
- DATTA, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, and M. E. Greenberg. 1997. «Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery». Cell, vol. 91, no. 2, p. 231-41.
- DECKWERTH, T. L. and E. M. Johnson Jr. 1993. «Temporal Analysis of Events Associated With Programmed Cell Death (Apoptosis) of Sympathetic Neurons Deprived of Nerve Growth Factor». J Cell Biol, vol. 123, no. 5, p. 1207-22.
- DEL PESO, L., V. M. Gonzalez, N. Inohara, R. E. Ellis, and G. Nunez. 2000. «Disruption of the CED-9.CED-4 Complex by EGL-1 Is a Critical Step for Programmed Cell Death in Caenorhabditis Elegans». J Biol Chem, vol. 275, no. 35, p. 27205-11.

- DEPRAETERE, V. and P. Golstein. 1997. «Fas and Other Cell Death Signaling Pathways». Semin Immunol, vol. 9, no. 2, p. 93-107.
- DESHARNAIS, Philippe. 2001. « Mécanisme d'induction de l'apoptose par le tributylétain: implication du CD45 dans le processus d'apoptose nucléaire ». Mémoire de maîtrise, Montréal, Université du Québec, 122p.
- DU, X. Y. and S. Sorota. 2000. «Cardiac Swelling-Induced Chloride Current Is Enhanced by Endothelin». J Cardiovasc Pharmacol, vol. 35, no. 5, p. 769-76.
- EARNSHAW, W. C., L. M. Martins, and S. H. Kaufmann. 1999. «Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis». Annu Rev Biochem, vol. 68, p. 383-424.
- EISCHEN, C. M., C. J. Dick, and P. J. Leibson. 1994. «Tyrosine Kinase Activation Provides an Early and Requisite Signal for Fas-Induced Apoptosis». J Immunol, vol. 153, no. 5, p. 1947-54.
- ELLIS, R. E., J. Y. Yuan, and H. R. Horvitz. 1991. «Mechanisms and Functions of Cell Death». Annu Rev Cell Biol, vol. 7, p. 663-98.
- ESTEVEZ, R. and T. J. Jentsch. 2002. «CLC Chloride Channels: Correlating Structure With Function». Curr Opin Struct Biol, vol. 12, no. 4, p. 531-9.
- FADEEL, B., S. Orrenius, and B. Zhivotovsky. 1999. «Apoptosis in Human Disease: a New Skin for the Old Ceremony?». Biochem Biophys Res Commun, vol. 266, no. 3, p. 699-717.
- FADOK, V. A. and G. Chimini. 2001. «The Phagocytosis of Apoptotic Cells». Semin Immunol, vol. 13, no. 6, p. 365-72.
- FAJKA-BOJA, R., M. Szemes, G. Ion, A. Legradi, M. Caron, and E. Monostori. 2002. «Receptor Tyrosine Phosphatase, CD45 Binds Galectin-1 but Does Not Mediate Its Apoptotic Signal in T Cell Lines». Immunol Lett, vol. 82, no. 1-2, p. 149-54.
- FERANCHAK, A. P., R. M. Roman, E. M. Schwiebert, and J. G. Fitz. 1998. «Phosphatidylinositol 3-Kinase Contributes to Cell Volume Regulation Through Effects on ATP Release». J Biol Chem, vol. 273, no. 24, p. 14906-11.
- FISCHER, H. and T. E. Machen. 1996. «The Tyrosine Kinase P60c-Src Regulates the Fast Gate of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Chloride Channel». Biophys J, vol. 71, no. 6, p. 3073-82.
- FORTIN, M., A. M. Steff, J. Felberg, I. Ding, B. Schraven, P. Johnson, and P. Hugo. 2002. «Apoptosis Mediated Through CD45 Is Independent of Its Phosphatase Activity and Association With Leukocyte Phosphatase-Associated Phosphoprotein». J Immunol, vol. 168, no. 12, p. 6084-9.

- FREARSON, J. A. and D. R. Alexander. 1996. «Protein Tyrosine Phosphatases in T-Cell Development, Apoptosis and Signalling». Immunol Today, vol. 17, no. 8, p. 385-91.
- GENNARI, A., M. Potters, W. Seinen, and R. Pieters. 1997. «Organotin-Induced Apoptosis As Observed in Vitro Is Not Relevant for Induction of Thymus Atrophy at Antiproliferative Doses». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 147, no. 2, p. 259-66.
- GOTTLIEB, R. A. 1999. «Mitochondria: Ignition Chamber for Apoptosis». Mol Genet Metab, vol. 68, no. 2, p. 227-31.
- GREEN, D. R. and J. C. Reed. 1998. «Mitochondria and Apoptosis». Science, vol. 281, no. 5381, p. 1309-12.
- GROSS, A., J. M. McDonnell, and S. J. Korsmeyer. 1999. «BCL-2 Family Members and the Mitochondria in Apoptosis». Genes Dev, vol. 13, no. 15, p. 1899-911.
- GU, J., R. P. Dong, C. Zhang, D. F. McLaughlin, M. X. Wu, and S. F. Schlossman. 1999. «Functional Interaction of DFF35 and DFF45 With Caspase-Activated DNA Fragmentation Nuclease DFF40». J Biol Chem, vol. 274, no. 30, p. 20759-62.
- GULBINS, E., A. Jekle, K. Ferlinz, H. Grassme et F. Lang. 2000. "Physiology of apoptosis". Am J Physiol Renal Physiol, vol. 279, p. F605-15.
- GULBINS, E., I. Szabo, K. Baltzer et F. Lang. 1997. "Ceramide-induced inhibition of T lymphocyte voltage-gated potassium channel is mediated by tyrosine kinases". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 94, p. 7661-6.
- HALL, S. R., B. M. Heffernan, N. T. Thompson, and W. C. Rowan. 1999. «CD4+ CD45RA+ and CD4+ CD45RO+ T Cells Differ in Their TCR-Associated Signaling Responses». Eur J Immunol, vol. 29, no. 7, p. 2098-106.
- HE, J. and L. G. Baum. 2003. «Presentation of Galectin-1 by Extracellular Matrix Triggers T Cell Death». J Biol Chem.
- HENGARTNER, M. O. 2000. «The Biochemistry of Apoptosis». Nature, vol. 407, no. 6805, p. 770-6.
- HENSON, P. M., D. L. Bratton, and V. A. Fadok. 2001. «Apoptotic Cell Removal». Curr Biol, vol. 11, no. 19, p. R795-805.
- HERMISTON, M. L., Z. Xu, and A. Weiss. 2003. «CD45: a Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells». Annu Rev Immunol, vol. 21, p. 107-37.
- HITOSHI, Y., J. Lorens, S. I. Kitada, J. Fisher, M. LaBarge, H. Z. Ring, U. Francke, J. C. Reed, S. Kinoshita, and G. P. Nolan. 1998. «Toso, a Cell Surface, Specific Regulator of Fas-Induced Apoptosis in T Cells». Immunity, vol. 8, no. 4, p. 461-71.

- HORVITZ, H. R. 1999. «Genetic Control of Programmed Cell Death in the Nematode *Caenorhabditis Elegans*». Cancer Res., vol. 59, no. 7 Suppl, p. 1701s-6s.
- HRYCIW, D. H. and W. B. Guggino. 2000. «Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator and the Outwardly Rectifying Chloride Channel: a Relationship Between Two Chloride Channels Expressed in Epithelial Cells». Clin Exp Pharmacol Physiol., vol. 27, no. 11, p. 892-5.
- HSU, H., J. Huang, H. B. Shu, V. Baichwal, and D. V. Goeddel. 1996. «TNF-Dependent Recruitment of the Protein Kinase RIP to the TNF Receptor-1 Signaling Complex». Immunity, vol. 4, no. 4, p. 387-96.
- HSU, H., J. Xiong, and D. V. Goeddel. 1995. «The TNF Receptor 1-Associated Protein TRADD Signals Cell Death and NF-Kappa B Activation». Cell, vol. 81, no. 4, p. 495-504.
- HU, S., C. Vincenz, J. Ni, R. Gentz, and V. M. Dixit. 1997. «I-FLICE, a Novel Inhibitor of Tumor Necrosis Factor Receptor-1- and CD-95-Induced Apoptosis». J Biol Chem, vol. 272, no. 28, p. 17255-7.
- HU, Y., M. A. Benedict, L. Ding, and G. Nunez. 1999. «Role of Cytochrome c and DATP/ATP Hydrolysis in Apaf-1-Mediated Caspase-9 Activation and Apoptosis». EMBO J, vol. 18, no. 13, p. 3586-95.
- HU, Y., L. Ding, D. M. Spencer, and G. Nunez. 1998. «WD-40 Repeat Region Regulates Apaf-1 Self-Association and Procaspace-9 Activation». J Biol Chem, vol. 273, no. 50, p. 33489-94.
- HUANG, D. C., J. M. Adams, and S. Cory. 1998. «The Conserved N-Terminal BH4 Domain of Bcl-2 Homologues Is Essential for Inhibition of Apoptosis and Interaction With CED-4». EMBO J, vol. 17, no. 4, p. 1029-39.
- HUGHES, F. M. Jr, C. D. Bortner, G. D. Purdy, and J. A. Cidlowski. 1997. «Intracellular K⁺ Suppresses the Activation of Apoptosis in Lymphocytes». J Biol Chem, vol. 272, no. 48, p. 30567-76.
- IDRISS, H. T., Y. A. Hannun, E. Boulpaep, and S. Basavappa. 2000. «Regulation of Volume-Activated Chloride Channels by P-Glycoprotein: Phosphorylation Has the Final Say!». J Physiol, vol. 524 Pt 3, p. 629-36.
- IGUCHI, K., S. Usui, R. Ishida, and K. Hirano. 2002. «Imidazole-Induced Cell Death, Associated With Intracellular Acidification, Caspase-3 Activation, DFF-45 Cleavage, but Not Oligonucleosomal DNA Fragmentation». Apoptosis, vol. 7, no. 6, p. 519-25.
- IMAI, Y., T. Kimura, A. Murakami, N. Yajima, K. Sakamaki, and S. Yonehara. 1999. «The CED-4-Homologous Protein FLASH Is Involved in Fas-Mediated Activation of Caspase-8 During Apoptosis». Nature, vol. 398, no. 6730, p. 777-85.

- INOHARA, N., T. Koseki, S. Chen, M. A. Benedict, and G. Nunez. 1999. «Identification of Regulatory and Catalytic Domains in the Apoptosis Nuclease DFF40/CAD». J Biol Chem, vol. 274, no. 1, p. 270-4.
- IRLES, C., A. Symons, F. Michel, T. R. Bakker, P. A. van der Merwe, and O. Acuto. 2003. «CD45 Ectodomain Controls Interaction With GEMs and Lck Activity for Optimal TCR Signaling». Nat Immunol, vol. 4, no. 2, p. 189-97.
- IRMLER, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French, and J. Tschopp. 1997. «Inhibition of Death Receptor Signals by Cellular FLIP». Nature, vol. 388, no. 6638, p. 190-5.
- ITOH, N. and S. Nagata. 1993. «A Novel Protein Domain Required for Apoptosis. Mutational Analysis of Human Fas Antigen». J Biol Chem, vol. 268, no. 15, p. 10932-7.
- JAATTELA, M. 1999. «Escaping Cell Death: Survival Proteins in Cancer». Exp Cell Res, vol. 248, no. 1, p. 30-43.
- JENTSCH, T. J., T. Friedrich, A. Schriever, and H. Yamada. 1999. «The CLC Chloride Channel Family». Pflugers Arch, vol. 437, no. 6, p. 783-95.
- JENTSCH, T. J., V. Stein, F. Weinreich, and A. A. Zdebik. 2002. «Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels». Physiol Rev, vol. 82, no. 2, p. 503-68.
- JENTSCH, T. J., K. Steinmeyer, and G. Schwarz. 1990. «Primary Structure of Torpedo Marmorata Chloride Channel Isolated by Expression Cloning in Xenopus Oocytes». Nature, vol. 348, no. 6301, p. 510-4.
- JIA, Y., C. J. Mathews, and J. W. Hanrahan. 1997. «Phosphorylation by Protein Kinase C Is Required for Acute Activation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator by Protein Kinase A». J Biol Chem, vol. 272, no. 8, p. 4978-84.
- JIANG, B., N. Hattori, B. Liu, K. Kitagawa, and C. Inagaki. 2002. «Expression of Swelling- and/or PH-Regulated Chloride Channels (ClC-2, 3, 4 and 5) in Human Leukemic and Normal Immune Cells». Life Sci, vol. 70, no. 12, p. 1383-94.
- JUSTEMENT, L. B., K. S. Campbell, N. C. Chien, and J. C. Cambier. 1991. «Regulation of B Cell Antigen Receptor Signal Transduction and Phosphorylation by CD45». Science, vol. 252, no. 5014, p. 1839-42.
- KAM, P. C. and N. I. Ferch. 2000. «Apoptosis: Mechanisms and Clinical Implications». Anaesthesia, vol. 55, no. 11, p. 1081-93.
- KAWANE, K., H. Fukuyama, H. Yoshida, H. Nagase, Y. Ohsawa, Y. Uchiyama, K. Okada, T. Iida, and S. Nagata. 2003. «Impaired Thymic Development in Mouse Embryos Deficient in Apoptotic DNA Degradation». Nat Immunol, vol. 4, no. 2, p. 138-44.

- KELEKAR, A., B. S. Chang, J. E. Harlan, S. W. Fesik, and C. B. Thompson. 1997. «Bad Is a BH3 Domain-Containing Protein That Forms an Inactivating Dimer With Bcl-XL». Mol Cell Biol, vol. 17, no. 12, p. 7040-6.
- KERR, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. «Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics». Br J Cancer, vol. 26, no. 4, p. 239-57.
- KIEFER, F., W. F. Vogel, and R. Arnold. 2002. «Signal Transduction and Co-Stimulatory Pathways». Transpl Immunol, vol. 9, no. 2-4, p. 69-82.
- KLASSEN, N. V., P. R. Walker, C. K. Ross, J. Cygler, and B. Lach. 1993. «Two-Stage Cell Shrinkage and the OER for Radiation-Induced Apoptosis of Rat Thymocytes». Int J Radiat Biol, vol. 64, no. 5, p. 571-81.
- KLAUS, S. J., S. P. Sidorenko, and E. A. Clark. 1996. «CD45 Ligation Induces Programmed Cell Death in T and B Lymphocytes». J Immunol, vol. 156, no. 8, p. 2743-53.
- KORNAK, U., D. Kasper, M. R. Bosl, E. Kaiser, M. Schweizer, A. Schulz, W. Friedrich, G. Delling, and T. J. Jentsch. 2001. «Loss of the CIC-7 Chloride Channel Leads to Osteopetrosis in Mice and Man». Cell, vol. 104, no. 2, p. 205-15.
- KRIESER, R. J. and K. White. 2002. «Engulfment Mechanism of Apoptotic Cells». Curr Opin Cell Biol, vol. 14, no. 6, p. 734-8.
- KROEMER, G. 1997. «The Proto-Oncogene Bcl-2 and Its Role in Regulating Apoptosis». Nat Med, vol. 3, no. 6, p. 614-20.
- KROEMER, G. 2003. «Mitochondrial Control of Apoptosis: an Introduction». Biochem Biophys Res Commun, vol. 304, no. 3, p. 433-5.
- LAMBERT, I. H. 1987. «Effect of Arachidonic Acid, Fatty Acids, Prostaglandins, and Leukotrienes on Volume Regulation in Ehrlich Ascites Tumor Cells». J Membr Biol, vol. 98, no. 3, p. 207-21.
- LAMBERT, I. H. 1989. «Leukotriene-D4 Induced Cell Shrinkage in Ehrlich Ascites Tumor Cells». J Membr Biol, vol. 108, no. 2, p. 165-76.
- LATINIS, K. M. and G. A. Koretzky. 1996. «Fas Ligation Induces Apoptosis and Jun Kinase Activation Independently of CD45 and Lck in Human T Cells». Blood, vol. 87, no. 3, p. 871-5.
- LAUBER, K., H. A. Appel, S. F. Schlosser, M. Gregor, K. Schulze-Osthoff, and S. Wesselborg. 2001. «The Adapter Protein Apoptotic Protease-Activating Factor-1 (Apaf-1) Is Proteolytically Processed During Apoptosis». J Biol Chem, vol. 276, no. 32, p. 29772-81.

- LECOEUR, H. 2002. «Nuclear Apoptosis Detection by Flow Cytometry: Influence of Endogenous Endonucleases». Exp Cell Res, vol. 277, no. 1, p. 1-14.
- LEFEBVRE, D. C., J. Felberg, J. L. Cross, and P. Johnson. 2003. «The Noncatalytic Domains of Lck Regulate Its Dephosphorylation by CD45». Biochim Biophys Acta, vol. 1650, no. 1-2, p. 40-9.
- LEPPLE-WIENHUES, A., I. Szabo, T. Laun, N. K. Kaba, E. Gulbins, and F. Lang. 1998. «The Tyrosine Kinase P56lck Mediates Activation of Swelling-Induced Chloride Channels in Lymphocytes». J Cell Biol, vol. 141, no. 1, p. 281-6.
- LEPPLE-WIENHUES, A., I. Szabo, U. Wieland, L. Heil, E. Gulbins, and F. Lang. 2000. «Tyrosine Kinases Open Lymphocyte Chloride Channels». Cell Physiol Biochem, vol. 10, no. 5-6, p. 307-12.
- LEPPLE-WIENHUES, A., U. Wieland, T. Laun, L. Heil, M. Stern et F. Lang. 2001. "A src-like kinase activates outwardly rectifying chloride channels in CFTR-defective lymphocytes". FASEB Journal, vol. 15, p. 927-31.
- LESAGE, S., A. M. Steff, F. Philippoussis, M. Page, S. Trop, V. Mateo, and P. Hugo. 1997. «CD4+ CD8+ Thymocytes Are Preferentially Induced to Die Following CD45 Cross-Linking, Through a Novel Apoptotic Pathway». J Immunol, vol. 159, no. 10, p. 4762-71.
- LI, H., H. Zhu, C. J. Xu, and J. Yuan. 1998. «Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis». Cell, vol. 94, no. 4, p. 491-501.
- LINDSTEN, T., A. J. Ross, A. King, W. X. Zong, J. C. Rathmell, H. A. Shiels, E. Ulrich, K. G. Waymire, P. Mahar, K. Frauwirth, Y. Chen, M. Wei, V. M. Eng, D. M. Adelman, M. C. Simon, A. Ma, J. A. Golden, G. Evan, S. J. Korsmeyer, G. R. MacGregor, and C. B. Thompson. 2000. «The Combined Functions of Proapoptotic Bcl-2 Family Members Bak and Bax Are Essential for Normal Development of Multiple Tissues». Mol Cell, vol. 6, no. 6, p. 1389-99.
- LIU, X., H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. 1997. «DFF, a Heterodimeric Protein That Functions Downstream of Caspase-3 to Trigger DNA Fragmentation During Apoptosis». Cell, vol. 89, no. 2, p. 175-84.
- LIU, X., H. Zou, P. Widlak, W. Garrard, and X. Wang. 1999. «Activation of the Apoptotic Endonuclease DFF40 (Caspase-Activated DNase or Nuclease). Oligomerization and Direct Interaction With Histone H1». J Biol Chem, vol. 274, no. 20, p. 13836-40.
- LOEFFLER, M. and G. Kroemer. 2000. «The Mitochondrion in Cell Death Control: Certainties and Incognita». Exp Cell Res, vol. 256, no. 1, p. 19-26.

- LUCIANO, F., J. E. Ricci, and P. Auberger. 2001. «Cleavage of Fyn and Lyn in Their N-Terminal Unique Regions During Induction of Apoptosis: a New Mechanism for Src Kinase Regulation». Oncogene, vol. 20, no. 36, p. 4935-41.
- MAENO, E., Y. Ishizaki, T. Kanaseki, A. Hazama, and Y. Okada. 2000. «Normotonic Cell Shrinkage Because of Disordered Volume Regulation Is an Early Prerequisite to Apoptosis». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 97, no. 17, p. 9487-92.
- MAJETI, R., A. M. Bilwes, J. P. Noel, T. Hunter, and A. Weiss. 1998. «Dimerization-Induced Inhibition of Receptor Protein Tyrosine Phosphatase Function Through an Inhibitory Wedge». Science, vol. 279, no. 5347, p. 88-91.
- MAJETI, R., Z. Xu, T. G. Parslow, J. L. Olson, D. I. Daikh, N. Killeen, and A. Weiss. 2000. «An Inactivating Point Mutation in the Inhibitory Wedge of CD45 Causes Lymphoproliferation and Autoimmunity». Cell, vol. 103, no. 7, p. 1059-70.
- MANOLOPOULOS, G. V., J. Prenen, G. Droogmans, and B. Nilius. 1997. «Thrombin Potentiates Volume-Activated Chloride Currents in Pulmonary Artery Endothelial Cells». Pflugers Arch, vol. 433, no. 6, p. 845-7.
- MARSDEN, V. S. and A. Strasser. 2003. «Control of Apoptosis in the Immune System: Bcl-2, BH3-Only Proteins and More». Annu Rev Immunol, vol. 21, p. 71-105.
- MARTIN, D. A., R. M. Siegel, L. Zheng, and M. J. Lenardo. 1998. «Membrane Oligomerization and Cleavage Activates the Caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) Death Signal». J Biol Chem, vol. 273, no. 8, p. 4345-9.
- MASUOKA, J., T. Shiraishi, M. Ichinose, T. Mineta, and K. Tabuchi. 2001. «Expression of ICAD-I and ICAD-S in Human Brain Tumor and Its Cleavage Upon Activation of Apoptosis by Anti-Fas Antibody». Jpn J Cancer Res, vol. 92, no. 7, p. 806-12.
- MATTHEWS, C. C. and E. L. Feldman. 1996. «Insulin-Like Growth Factor I Rescues SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells From Hyperosmotic Induced Programmed Cell Death». J Cell Physiol, vol. 166, no. 2, p. 323-31.
- MCCARTY, J. S., S. Y. Toh, and P. Li. 1999. «Study of DFF45 in Its Role of Chaperone and Inhibitor: Two Independent Inhibitory Domains of DFF40 Nuclease Activity». Biochem Biophys Res Commun, vol. 264, no. 1, p. 176-80.
- MEISENHOLDER, G. W., S. J. Martin, D. R. Green, J. Nordberg, B. M. Babor et R. A. Gottlieb. 1996. "Events in apoptosis. Acidification is downstream of protease activation and BCL-2 protection". Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 16260-2.
- MINDELL, J. A. and M. Maduke. 2001. «CIC Chloride Channels». Genome Biol, vol. 2, no. 2, p. REVIEWS3003.

- MITAMURA, S., H. Ikawa, N. Mizuno, Y. Kaziro, and H. Itoh. 1998. «Cytosolic Nuclease Activated by Caspase-3 and Inhibited by DFF-45». Biochem Biophys Res Commun, vol. 243, no. 2, p. 480-4.
- MORALES, M. P., A. Galvez, J. M. Eltit, P. Ocaranza, G. Diaz-Araya, and S. Lavandero. 2000. «IGF-1 Regulates Apoptosis of Cardiac Myocyte Induced by Osmotic-Stress». Biochem Biophys Res Commun, vol. 270, no. 3, p. 1029-35.
- MOTOYA, S., K. Kitamura, A. Matsuda, A. L. Maizel, H. Yamamoto, and A. Takeda. 1999. «Interaction Between CD45-AP and Protein-Tyrosine Kinases Involved in T Cell Receptor Signaling». J Biol Chem, vol. 274, no. 3, p. 1407-14.
- MUSTELIN, T., S. Williams, P. Taylor, C. Couture, G. Zenner, P. Burn, J. D. Ashwell, and A. Altman. 1995. «Regulation of the P70zap Tyrosine Protein Kinase in T Cells by the CD45 Phosphotyrosine Phosphatase». Eur J Immunol, vol. 25, no. 4, p. 942-6.
- NGUYEN, J. T., D. P. Evans, M. Galvan, K. E. Pace, D. Leitenberg, T. N. Bui, and L. G. Baum. 2001. «CD45 Modulates Galectin-1-Induced T Cell Death: Regulation by Expression of Core 2 O-Glycans». J Immunol, vol. 167, no. 10, p. 5697-707.
- NILIUS, B. and G. Droogmans. 2003. «Amazing Chloride Channels: an Overview». Acta Physiol Scand, vol. 177, no. 2, p. 119-47.
- NILIUS, B., J. Sehrer, P. De Smet, W. Van Driessche, and G. Droogmans. 1995. «Volume Regulation in a Toad Epithelial Cell Line: Role of Coactivation of K⁺ and Cl⁻ Channels». J Physiol, vol. 487 (Pt 2), p. 367-78.
- NILIUS, B., T. Voets, J. Prenen, H. Barth, K. Aktories, K. Kaibuchi, G. Droogmans, and J. Eggermont. 1999. «Role of Rho and Rho Kinase in the Activation of Volume-Regulated Anion Channels in Bovine Endothelial Cells». J Physiol, vol. 516 (Pt 1), p. 67-74.
- NISHIMOTO, I., J. A. Wagner, H. Schulman, and P. Gardner. 1991. «Regulation of Cl⁻ Channels by Multifunctional CaM Kinase». Neuron, vol. 6, no. 4, p. 547-55.
- OKADA, Y. and E. Maeno. 2001. «Apoptosis, Cell Volume Regulation and Volume-Regulatory Chloride Channels». Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, vol. 130, no. 3, p. 377-83.
- OKADA, Y., E. Maeno, T. Shimizu, K. Dezaki, J. Wang, and S. Morishima. 2001. «Receptor-Mediated Control of Regulatory Volume Decrease (RVD) and Apoptotic Volume Decrease (AVD)». J Physiol, vol. 532, no. Pt 1, p. 3-16.
- OSTEDGAARD, L. S., O. Baldursson, and M. J. Welsh. 2001. «Regulation of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Cl⁻ Channel by Its R Domain». J Biol Chem, vol. 276, no. 11, p. 7689-92.

- PACE, K. E., C. Lee, P. L. Stewart, and L. G. Baum. 1999. «Restricted Receptor Segregation into Membrane Microdomains Occurs on Human T Cells During Apoptosis Induced by Galectin-1». J Immunol, vol. 163, no. 7, p. 3801-11.
- PENNINGER, J. M., J. Irie-Sasaki, T. Sasaki, and A. J. Oliveira-dos-Santos. 2001. «CD45: New Jobs for an Old Acquaintance». Nat Immunol, vol. 2, no. 5, p. 389-96.
- PERILLO, N. L., K. E. Pace, J. J. Seilhamer, and L. G. Baum. 1995. «Apoptosis of T Cells Mediated by Galectin-1». Nature, vol. 378, no. 6558, p. 736-9.
- PERILLO, N. L., C. H. Uittenbogaart, J. T. Nguyen, and L. G. Baum. 1997. «Galectin-1, an Endogenous Lectin Produced by Thymic Epithelial Cells, Induces Apoptosis of Human Thymocytes». J Exp Med, vol. 185, no. 10, p. 1851-8.
- PETER, M. E., A. E. Heufelder, and M. O. Hengartner. 1997. «Advances in Apoptosis Research». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 94, no. 24, p. 12736-7.
- PHIPPS, D. J., D. R. Branch, and L. C. Schlichter. 1996. «Chloride-Channel Block Inhibits T Lymphocyte Activation and Signalling». Cell Signal, vol. 8, no. 2, p. 141-9.
- PREMACK, B. A. and P. Gardner. 1991. «Role of Ion Channels in Lymphocytes». J Clin Immunol, vol. 11, no. 5, p. 225-38.
- PROSKURYAKOV, S. Y., A. G. Konoplyannikov, and V. L. Gabai. 2003. «Necrosis: a Specific Form of Programmed Cell Death?». Exp Cell Res, vol. 283, no. 1, p. 1-16.
- RAFFRAY, M. and G. M. Cohen. 1993. «Thymocyte Apoptosis As a Mechanism for Tributyltin-Induced Thymic Atrophy in Vivo». Arch Toxicol, vol. 67, no. 4, p. 231-6.
- RAFFRAY, M. and G. M. Cohen. 1998. «Re: Organotin-Induced Apoptosis As Observed in Vitro Is Not Relevant for Induction of Thymus Atrophy at Antiproliferative Doses. (Article No. TO978265)». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 153, no. 1, p. 136-8.
- RAO, N., S. Miyake, A. L. Reddi, P. Douillard, A. K. Ghosh, I. L. Dodge, P. Zhou, N. D. Fernandes, and H. Band. 2002. «Negative Regulation of Lck by Cbl Ubiquitin Ligase». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 99, no. 6, p. 3794-9.
- RASOLA, A., D. Farahi Far, P. Hofman, and B. Rossi. 1999. «Lack of Internucleosomal DNA Fragmentation Is Related to Cl(-) Efflux Impairment in Hematopoietic Cell Apoptosis». FASEB J, vol. 13, no. 13, p. 1711-23.
- RAVICHANDRAN, K. S. 2003. «"Recruitment Signals" From Apoptotic Cells: Invitation to a Quiet Meal». Cell, vol. 113, no. 7, p. 817-20.
- RAY, C. A., R. A. Black, S. R. Kronheim, T. A. Greenstreet, P. R. Sleath, G. S. Salvesen, and D. J. Pickup. 1992. «Viral Inhibition of Inflammation: Cowpox Virus Encodes an Inhibitor of the Interleukin-1 Beta Converting Enzyme». Cell, vol. 69, no. 4, p. 597-604.

- RESH, M. D. 1998. «Fyn, a Src Family Tyrosine Kinase». Int J Biochem Cell Biol, vol. 30, no. 11, p. 1159-62.
- RIEUX-LAUCAT, F. 2000. « Signalisation de l'apoptose par Fas ». Hématologie, vol. 6, no. 2, p. 136-142.
- ROMAN, R. M., R. L. Smith, A. P. Feranchak, G. H. Clayton, R. B. Doctor, and J. G. Fitz. 2001. «ClC-2 Chloride Channels Contribute to HTC Cell Volume Homeostasis». Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, vol. 280, no. 3, p. G344-53.
- ROY, N., Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen, and J. C. Reed. 1997. «The C-IAP-1 and C-IAP-2 Proteins Are Direct Inhibitors of Specific Caspases». EMBO J, vol. 16, no. 23, p. 6914-25.
- SAKAHIRA, H., M. Enari, and S. Nagata. 1998. «Cleavage of CAD Inhibitor in CAD Activation and DNA Degradation During Apoptosis». Nature, vol. 391, no. 6662, p. 96-9.
- SAKAHIRA, H. and S. Nagata. 2002. «Co-Translational Folding of Caspase-Activated DNase With Hsp70, Hsp40, and Inhibitor of Caspase-Activated DNase». J Biol Chem, vol. 277, no. 5, p. 3364-70.
- SAMEJIMA, K. and W. C. Earnshaw. 2000. «Differential Localization of ICAD-L and ICAD-S in Cells Due to Removal of a C-Terminal NLS From ICAD-L by Alternative Splicing». Exp Cell Res, vol. 255, no. 2, p. 314-20.
- SAMEJIMA, K. and W. C. Earnshaw. 1998. «ICAD/DFF Regulator of Apoptotic Nuclease Is Nuclear». Exp Cell Res, vol. 243, no. 2, p. 453-9.
- SAMEJIMA, K., S. Tone, and W. C. Earnshaw. 2001. «CAD/DFF40 Nuclease Is Dispensable for High Molecular Weight DNA Cleavage and Stage I Chromatin Condensation in Apoptosis». J Biol Chem, vol. 276, no. 48, p. 45427-32.
- SATO, T., S. Irie, S. Kitada, and J. C. Reed. 1995. «FAP-1: a Protein Tyrosine Phosphatase That Associates With Fas». Science, vol. 268, no. 5209, p. 411-5.
- SATTLER, M., H. Liang, D. Nettesheim, R. P. Meadows, J. E. Harlan, M. Eberstadt, H. S. Yoon, S. B. Shuker, B. S. Chang, A. J. Minn, C. B. Thompson, and S. W. Fesik. 1997. «Structure of Bcl-XL-Bak Peptide Complex: Recognition Between Regulators of Apoptosis». Science, vol. 275, no. 5302, p. 983-6.
- SCAFFIDI, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer, and M. E. Peter. 1998. «Two CD95 (APO-1/Fas) Signaling Pathways». EMBO J, vol. 17, no. 6, p. 1675-87.
- SCAFFIDI, C., I. Schmitz, J. Zha, S. J. Korsmeyer, P. H. Krammer, and M. E. Peter. 1999. «Differential Modulation of Apoptosis Sensitivity in CD95 Type I and Type II Cells». J Biol Chem, vol. 274, no. 32, p. 22532-8.

SCHOLZ, S. R., C. Korn, O. Gimadutdinow, M. Knoblauch, A. Pingoud, and G. Meiss. 2002. «The Effect of ICAD-S on the Formation and Intracellular Distribution of a Nucleolytically Active Caspase-Activated DNase». Nucleic Acids Res, vol. 30, no. 14, p. 3045-51.

SCHRAVEN, B. and M. E. Peter. 1995. «APO-1(CD95)-Mediated Apoptosis in Jurkat Cells Does Not Involve Src Kinases or CD45». FEBS Lett, vol. 368, no. 3, p. 491-4.

SEAVITT, J. R., L. S. White, K. M. Murphy, D. Y. Loh, R. M. Perlmutter, and M. L. Thomas. 1999. «Expression of the P56(Lck) Y505F Mutation in CD45-Deficient Mice Rescues Thymocyte Development». Mol Cell Biol, vol. 19, no. 6, p. 4200-8.

SÉGAL-BENDIRDJIAN, E. 1999. « Mort cellulaire: signalisation et exécution de l'apoptose ». Hématologie, vol. 5, no 5, p. 376-387.

SEIBERT, F. S., X. B. Chang, A. A. Aleksandrov, D. M. Clarke, J. W. Hanrahan, and J. R. Riordan. 1999. «Influence of Phosphorylation by Protein Kinase A on CFTR at the Cell Surface and Endoplasmic Reticulum». Biochim Biophys Acta, vol. 1461, no. 2, p. 275-83.

SHAHAM, S. and H. R. Horvitz. 1996. «An Alternatively Spliced C. Elegans Ced-4 RNA Encodes a Novel Cell Death Inhibitor». Cell, vol. 86, no. 2, p. 201-8.

SHEPPARD, D. N. and M. J. Welsh. 1999. «Structure and Function of the CFTR Chloride Channel». Physiol Rev, vol. 79, no. 1 Suppl, p. S23-45.

SOLARY, E., B. Eymin, N. Droin, and M. Haugg. 1998. «Proteases, Proteolysis, and Apoptosis». Cell Biol Toxicol, vol. 14, no. 2, p. 121-32.

SRINIVASULA, S. M., P. Datta, X. J. Fan, T. Fernandes-Alnemri, Z. Huang, and E. S. Alnemri. 2000. «Molecular Determinants of the Caspase-Promoting Activity of Smac/DIABLO and Its Role in the Death Receptor Pathway». J Biol Chem, vol. 275, no. 46, p. 36152-7.

STOBRAWA, S. M., T. Breiderhoff, S. Takamori, D. Engel, M. Schweizer, A. A. Zdebik, M. R. Bosl, K. Ruether, H. Jahn, A. Draguhn, R. Jahn, and T. J. Jentsch. 2001. «Disruption of ClC-3, a Chloride Channel Expressed on Synaptic Vesicles, Leads to a Loss of the Hippocampus». Neuron, vol. 29, no. 1, p. 185-96.

STOUT, J. G., F. Basse, R. A. Luhm, H. J. Weiss, T. Wiedmer et P. J. Sims. 1997. "Scott syndrome erythrocytes contain a membrane protein capable of mediating Ca²⁺-dependent transbilayer migration of membrane phospholipids". Journal of Clinical Investigation, vol. 99, p. 2232-8.

STRIDH, H., M. Kimland, D. P. Jones, S. Orrenius, and M. B. Hampton. 1998. «Cytochrome c Release and Caspase Activation in Hydrogen Peroxide- and Tributyltin-Induced Apoptosis». FEBS Lett, vol. 429, no. 3, p. 351-5.

- STRIDH, H., S. Orrenius, and M. B. Hampton. 1999. «Caspase Involvement in the Induction of Apoptosis by the Environmental Toxicants Tributyltin and Triphenyltin». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 156, no. 2, p. 141-6.
- SUSIN, S. A., E. Daugas, L. Ravagnan, K. Samejima, N. Zamzami, M. Loeffler, P. Costantini, K. F. Ferri, T. Irinopoulou, M. C. Prevost, G. Brothers, T. W. Mak, J. Penninger, W. C. Earnshaw, and G. Kroemer. 2000. «Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis». J Exp Med, vol. 192, no. 4, p. 571-80.
- SYMONS, A., D. N. Cooper, and A. N. Barclay. 2000. «Characterization of the Interaction Between Galectin-1 and Lymphocyte Glycoproteins CD45 and Thy-1». Glycobiology, vol. 10, no. 6, p. 559-63.
- SYMONS, A., A. C. Willis, and A. N. Barclay. 1999. «Domain Organization of the Extracellular Region of CD45». Protein Eng, vol. 12, no. 10, p. 885-92.
- SZABO, I., A. Lepple-Wienhues, K. N. Kaba, M. Zoratti, E. Gulbins, and F. Lang. 1998. «Tyrosine Kinase-Dependent Activation of a Chloride Channel in CD95-Induced Apoptosis in T Lymphocytes». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 95, no. 11, p. 6169-74.
- TAKAHASHI, R., Q. Deveraux, I. Tamm, K. Welsh, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen, and J. C. Reed. 1998. «A Single BIR Domain of XIAP Sufficient for Inhibiting Caspases». J Biol Chem, vol. 273, no. 14, p. 7787-90.
- TAKEDA, A., J. J. Wu, and A. L. Maizel. 1992. «Evidence for Monomeric and Dimeric Forms of CD45 Associated With a 30-KDa Phosphorylated Protein». J Biol Chem, vol. 267, no. 23, p. 16651-9.
- TATOSYAN, A. G. and O. A. Mizenina. 2000. «Kinases of the Src Family: Structure and Functions». Biochemistry (Mosc), vol. 65, no. 1, p. 49-58.
- TEULON J. and A. Vandewalle. 2002. « Fonctions physiologiques des canaux de chlorure de la famille ClC ». Médecine Sciences, vol. 18, p. 595-604.
- THOMAS, D. A., C. Du, M. Xu, X. Wang, and T. J. Ley. 2000. «DFF45/ICAD Can Be Directly Processed by Granzyme B During the Induction of Apoptosis». Immunity, vol. 12, no. 6, p. 621-32.
- THOMAS, M. L. and E. J. Brown. 1999. «Positive and Negative Regulation of Src-Family Membrane Kinases by CD45». Immunol Today, vol. 20, no. 9, p. 406-11.
- THOMAS, S. M. and J. S. Brugge. 1997. «Cellular Functions Regulated by Src Family Kinases». Annu Rev Cell Dev Biol, vol. 13, p. 513-609.
- THOMPSON, C. B. 1995. «Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease». Science, vol. 267, no. 5203, p. 1456-62.

- THOMPSON, T. A., J. M. Lewis, N. S. Dejneka, W. B. Severs, R. Polavarapu, and M. L. Billingsley. 1996. «Induction of Apoptosis by Organotin Compounds in Vitro: Neuronal Protection With Antisense Oligonucleotides Directed Against Stannin». J Pharmacol Exp Ther, vol. 276, no. 3, p. 1201-16.
- THORNBERRY, N. A. and Y. Lazebnik. 1998. «Caspases: Enemies Within». Science, vol. 281, no. 5381, p. 1312-6.
- THOROED, S. M., A. Bryan-Sisneros, and P. Doroshenko. 1999. «Protein Phosphotyrosine Phosphatase Inhibitors Suppress Regulatory Volume Decrease and the Volume-Sensitive Cl⁻ Conductance in Mouse Fibroblasts». Pflugers Arch, vol. 438, no. 2, p. 133-40.
- TITTEL, J. N. and H. Steller. 2000. «A Comparison of Programmed Cell Death Between Species». Genome Biol, vol. 1, no. 3, p. REVIEWS0003.
- TOH, S. Y., X. Wang, and P. Li. 1998. «Identification of the Nuclear Factor HMG2 As an Activator for DFF Nuclease Activity». Biochem Biophys Res Commun, vol. 250, no. 3, p. 598-601.
- TROWBRIDGE, I. S. and M. L. Thomas. 1994. «CD45: an Emerging Role As a Protein Tyrosine Phosphatase Required for Lymphocyte Activation and Development». Annu Rev Immunol, vol. 12, p. 85-116.
- TSUJIMOTO, Y. 2003. «Cell Death Regulation by the Bcl-2 Protein Family in the Mitochondria». J Cell Physiol, vol. 195, no. 2, p. 158-67.
- TSUJIMOTO, Y. and C. M. Croce. 1986. «Analysis of the Structure, Transcripts, and Protein Products of Bcl-2, the Gene Involved in Human Follicular Lymphoma». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 83, no. 14, p. 5214-8.
- TZIVION, G., Y. H. Shen, and J. Zhu. 2001. «14-3-3 Proteins; Bringing New Definitions to Scaffolding». Oncogene, vol. 20, no. 44, p. 6331-8.
- VALVERDE, M. A. 1999. «ClC Channels: Leaving the Dark Ages on the Verge of a New Millennium». Curr Opin Cell Biol, vol. 11, no. 4, p. 509-16.
- VAN GURP, M., N. Festjens, G. van Loo, X. Saelens, and P. Vandenabeele. 2003. «Mitochondrial Intermembrane Proteins in Cell Death». Biochem Biophys Res Commun, vol. 304, no. 3, p. 487-97.
- VAN LEEUWEN, J. E. and L. E. Samelson. 1999. «T Cell Antigen-Receptor Signal Transduction». Curr Opin Immunol, vol. 11, no. 3, p. 242-8.
- VERHAGEN, A. M. and D. L. Vaux. 2002. «Cell Death Regulation by the Mammalian IAP Antagonist Diablo/Smac». Apoptosis, vol. 7, no. 2, p. 163-6.

- VOETS, T., V. Manolopoulos, J. Eggermont, C. Ellory, G. Droogmans, and B. Nilius. 1998. «Regulation of a Swelling-Activated Chloride Current in Bovine Endothelium by Protein Tyrosine Phosphorylation and G Proteins». J Physiol, vol. 506 (Pt 2), p. 341-52.
- WALKER, P. R., J. Leblanc, B. Smith, S. Pandey, and M. Sikorska. 1999. «Detection of DNA Fragmentation and Endonucleases in Apoptosis». Methods, vol. 17, no. 4, p. 329-38.
- WALZEL, H., U. Schulz, P. Neels, and J. Brock. 1999. «Galectin-1, a Natural Ligand for the Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase CD45». Immunol Lett, vol. 67, no. 3, p. 193-202.
- WANG, C. Y., M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel, and A. S. Baldwin Jr. 1998. «NF-KappaB Antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and C-IAP1 and C-IAP2 to Suppress Caspase-8 Activation». Science, vol. 281, no. 5383, p. 1680-3.
- WANG, Y. X. and M. I. Kotlikoff. 1997. «Inactivation of Calcium-Activated Chloride Channels in Smooth Muscle by Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 94, no. 26, p. 14918-23.
- WEAVER, C. T., J. T. Pingel, J. O. Nelson, and M. L. Thomas. 1991. «CD8+ T-Cell Clones Deficient in the Expression of the CD45 Protein Tyrosine Phosphatase Have Impaired Responses to T-Cell Receptor Stimuli». Mol Cell Biol, vol. 11, no. 9, p. 4415-22.
- WESSELBORG, S. et D. Kabelitz. 1993. "Activation-driven death of human T cell clones: time course kinetics of the induction of cell shrinkage, DNA fragmentation, and cell death". Cellular Immunology, vol. 148, p. 234-41.
- WIDLAK, P. 2000. «The DFF40/CAD Endonuclease and Its Role in Apoptosis». Acta Biochim Pol, vol. 47, no. 4, p. 1037-44.
- WIDLAK, P. and W. T. Garrard. 2001. «Ionic and Cofactor Requirements for the Activity of the Apoptotic Endonuclease DFF40/CAD». Mol Cell Biochem, vol. 218, no. 1-2, p. 125-30.
- WIDLAK, P., J. Lanuszewska, R. B. Cary, and W. T. Garrard. 2003. «Subunit Structures and Stoichiometries of Human DNA Fragmentation Factor Proteins Before and After Induction of Apoptosis». J Biol Chem, vol. 278, no. 29, p. 26915-22.
- WOLTER, K. G., Y. T. Hsu, C. L. Smith, A. Nechushtan, X. G. Xi, and R. J. Youle. 1997. «Movement of Bax From the Cytosol to Mitochondria During Apoptosis». J Cell Biol, vol. 139, no. 5, p. 1281-92.
- XU, Z. and A. Weiss. 2002. «Negative Regulation of CD45 by Differential Homodimerization of the Alternatively Spliced Isoforms». Nat Immunol, vol. 3, no. 8, p. 764-71.

- YANG, X., R. Khosravi-Far, H. Y. Chang, and D. Baltimore. 1997. «Daxx, a Novel Fas-Binding Protein That Activates JNK and Apoptosis». Cell, vol. 89, no. 7, p. 1067-76.
- YIN, X. M., Y. Luo, G. Cao, L. Bai, W. Pei, D. K. Kuharsky, and J. Chen. 2002. «Bid-Mediated Mitochondrial Pathway Is Critical to Ischemic Neuronal Apoptosis and Focal Cerebral Ischemia». J Biol Chem, vol. 277, no. 44, p. 42074-81.
- YU, S. P., L. M. Canzoniero, and D. W. Choi. 2001. «Ion Homeostasis and Apoptosis». Curr Opin Cell Biol, vol. 13, no. 4, p. 405-11.
- YU, S. P. and D. W. Choi. 2000. «Ions, Cell Volume, and Apoptosis». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 97, no. 17, p. 9360-2.
- YUAN, J., S. Shaham, S. Ledoux, H. M. Ellis, and H. R. Horvitz. 1993. «The C. Elegans Cell Death Gene Ced-3 Encodes a Protein Similar to Mammalian Interleukin-1 Beta-Converting Enzyme». Cell, vol. 75, no. 4, p. 641-52.
- ZAMZAMI, N., P. Marchetti, M. Castedo, D. Decaudin, A. Macho, T. Hirsch, S. A. Susin, P. X. Petit, B. Mignotte, and G. Kroemer. 1995. «Sequential Reduction of Mitochondrial Transmembrane Potential and Generation of Reactive Oxygen Species in Early Programmed Cell Death». J Exp Med, vol. 182, no. 2, p. 367-77.
- ZHA, H., C. Aime-Sempe, T. Sato, and J. C. Reed. 1996a. «Proapoptotic Protein Bax Heterodimerizes With Bcl-2 and Homodimerizes With Bax Via a Novel Domain (BH3) Distinct From BH1 and BH2». J Biol Chem, vol. 271, no. 13, p. 7440-4.
- ZHA, J., H. Harada, K. Osipov, J. Jockel, G. Waksman, and S. J. Korsmeyer. 1997. «BH3 Domain of BAD Is Required for Heterodimerization With BCL-XL and Pro-Apoptotic Activity». J Biol Chem, vol. 272, no. 39, p. 24101-4.
- ZHA, J., H. Harada, E. Yang, J. Jockel, and S. J. Korsmeyer. 1996b. «Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-X(L)». Cell, vol. 87, no. 4, p. 619-28.
- ZHANG, J., X. Liu, D. C. Scherer, L. van Kaer, X. Wang, and M. Xu. 1998. «Resistance to DNA Fragmentation and Chromatin Condensation in Mice Lacking the DNA Fragmentation Factor 45». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 95, no. 21, p. 12480-5.

