

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

IMPLICATION DU CD45 DANS L' APOPTOSE DES LYMPHOCYTES T

Par
Geneviève Dupéré-Minier

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en virologie-immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Dr Denis Girard,
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Dr Sylvie Lesage,
Hôpital Maisonneuve-Rosemont
Centre de recherche Guy Bernier
Université de Montréal

Examineur externe

Dr Benoit Barbeau,
Université du Québec à Montréal

Directeur de recherche

Dr Jacques Bernier,
INRS-Institut Armand-Frappier

Résumé

Le CD45 est une tyrosine phosphatase transmembranaire de type 1 retrouvé chez toutes les cellules hématopoïétiques nucléées. Le CD45 représente jusqu'à 10% de toutes les molécules de surface et son activité phosphatase représente plus de 90% de l'activité phosphatase totale de la cellule. Cette phosphatase est un important régulateur de voies de signalisation chez les cellules du système immunitaire. 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 effet, les résultats obtenus dans notre laboratoire montrent que le CD45 est impliqué dans la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN des cellules T induites en apoptose par des agents toxiques. Contrairement aux cellules T normales (CD45+), les cellules déficientes pour l'expression du CD45 (CD45-) sont résistantes à l'apoptose nucléaire. Bien qu'il y ait absence d'apoptose nucléaire chez les cellules CD45-, la voie apoptotique mitochondriale semble enclenchée. En effet, il a été démontré chez les cellules CD45+ et CD45- une augmentation du calcium intracellulaire, une dissipation du potentiel membranaire mitochondriale, la libération du cytochrome c, l'activation de la caspase-3 et le clivage du DFF45. De plus, l'isolation des différentes fractions cellulaires a permis de montrer une diminution de la localisation nucléaire de la caspase-3 et du DFF40. Nous avons également préalablement démontré que le CD45 joue un rôle important dans l'apoptose nucléaire par la régulation de l'homéostasie ionique de la cellule. Le but de ce projet de doctorat était de caractériser l'apoptose chez les cellules déficientes pour l'expression du CD45 afin d'élucider les mécanismes de régulation du CD45 dans l'apoptose nucléaire chez les cellules T.

Le premier volet consistait à explorer l'importance de l'expression du CD45 sur les mécanismes de régulation de l'apoptose nucléaire. Nos résultats ont démontré un clivage normal de deux molécules inhibitrices de l'apoptose nucléaire, PARP-1 et NuMa chez les cellules CD45-. Par contre, chez ces cellules, nous avons observé un clivage sélectif des pores nucléaires. En analysant le DFF40, l'endonucléase responsable de la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose, nous avons confirmé par immunofluorescence que sa

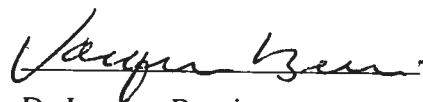
localisation nucléaire était perturbée chez les cellules CD45-. Nous avons aussi démontré qu'en absence du CD45, l'oligomérisation du DFF40 est perturbée. De plus, le DFF40 est exprimé sous différentes formes oligomériques après induction de l'apoptose qui diffèrent selon l'expression du CD45. Nous avons également identifié des modifications post-traductionnelles chez le complexe DFF où la phosphorylation sur les résidus tyrosine du DFF45 est inhibée et l'acétylation du DFF40 augmentée chez les cellules CD45-. Le CD45 joue donc un rôle important dans l'apoptose nucléaire et semble agir, entre autres, sur les mécanismes de régulation du DFF40.

Le deuxième volet consistait à évaluer le rôle du CD45 dans l'apoptose nucléaire en caractérisant les principales voies de signalisation en aval du CD45 et en évaluant des événements impliqués dans l'apoptose. Nos résultats ont premièrement démontré que l'absence du CD45 inhibe la production d'espèces réactives oxygénées (ROS), fortement induite chez les cellules normales, CD45+. L'activation des MAPKS p38, Erk et JNK est spécifiquement régulée par l'expression du CD45. De plus, les protéines kinases p38, JNK, Akt et PKC δ , situées en aval de la régulation du CD45, détiennent une augmentation de leur activité en absence de la molécule CD45 suite à l'induction de l'apoptose. Par contre, l'exposition d'inhibiteurs spécifiques de ces kinases ne rétablit pas la fragmentation de l'ADN chez les cellules CD45-. Fait intéressant, nous avons montré que le facteur de transcription NF- κ B est constitutivement actif chez les cellules CD45-. Toutefois, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique à l'activation de NF- κ B ne rétablit pas l'apoptose nucléaire chez les cellules CD45-. Ces résultats suggèrent donc que le CD45 détient un rôle important dans l'apoptose nucléaire en régulant plusieurs molécules qui jouent un rôle sur les mécanismes intramoléculaires régulant l'apoptose nucléaire.



Geneviève Dupéré-Minier

Étudiante



Dr Jacques Bernier

Directeur de recherche

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Jacques Bernier, qui m'a accueillie dans son laboratoire il y a bientôt 8 ans. Merci pour la confiance que tu m'as donnée tout au long de ces années, pour ton aide, ton soutien et pour l'expérience que j'ai acquise durant mes études supérieures.

Merci aux évaluateurs de ma thèse, Dr Denis Girard, Dr Sylvie Lesage et Dr Benoit Barbeau pour le temps qu'ils ont consacré à évaluer attentivement cette thèse.

Je tiens également à remercier mes collègues que j'ai côtoyés au site Pointe-Claire et au nouveau pavillon à Laval dont plus particulièrement Michele D'Elia, Julie Patenaude, Charles Dupras, Julie Dufresne, Kathy Turcotte, François Binet, Thérèse Choisi, Eliane Moisan et Martin Pelletier.

Merci à ma famille, ceux qui sont mes plus chers. Merci à ma mère qui m'a constamment encouragée et supportée dans les moments les plus difficiles. Merci aussi pour tes cadeaux qui m'ont beaucoup aidé financièrement. Merci à mon père qui nous aide tous du haut du ciel. Merci à mon frère pour ses encouragements. Un énorme merci à mon conjoint qui est devenu mon époux durant mon doctorat. Merci pour ton amour, ta patience, ton soutien, ta contribution financière et ta compréhension. J'ai fait beaucoup de sacrifices pour faire ce doctorat mais tu en as fait également. Un gros bonheur est arrivé dans ma vie à la fin de mon doctorat, mon fils. Merci mon petit coco d'être venu dans ma vie, merci pour ta joie de vivre et le bonheur que tu nous apportes.

Ce projet n'aurait pas pu voir le jour sans les organismes subventionnaires. Je veux donc remercier en premier lieu l'organisme qui a permis la réalisation des expériences, le CRSNG qui a subventionné ce projet. Un énorme merci aux organismes qui m'ont attribué une bourse me permettant de subvenir à mes besoins durant plus de 5 ans, c'est-à-dire la Fondation Armand-Frappier, le CRSNG ainsi que la Fondation Desjardins qui m'a sauvé financièrement pendant mes 2 dernières sessions de doctorat.

Table des matières

RÉSUMÉ	II
REMERCIEMENTS	IV
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	IX
INTRODUCTION	1
SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
CHAPITRE 1: MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE : L' APOPTOSE	5
1.1 INTRODUCTION	5
1.1.1 L' APOPTOSE VERSUS LA NÉCROSE	5
1.1.2 AUTRES TYPES DE MORT CELLULAIRE	7
1.1.3 LA DÉCOUVERTE DE L' APOPTOSE	10
1.1.4 IMPORTANCE DE L' APOPTOSE POUR UN ÉQUILIBRE HARMONIEUX	10
1.1.5 LA PHAGOCYTOSE DES CELLULES APOPTOTIQUES	11
1.2 LES DIFFÉRENTES VOIES D' ACTIVATION DE L' APOPTOSE	12
1.2.1 LA VOIE INTRINSÈQUE MITOCHONDRIALE.....	13
1.2.2 LA VOIE EXTRINSÈQUE DES RÉCEPTEURS DE MORT	15
1.2.2.1 Régulation de la signalisation des récepteurs de mort	18
1.2.2.2 Communication avec la voie mitochondriale.....	20
1.2.3 LA VOIE INDÉPENDANTE DES CASPASES.....	20
1.2.4 LE STRESS AU NIVEAU DU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE	21
1.2.5 LE GÈNE SUPPRESSEUR DE TUMEUR P53 ET L' APOPTOSE.....	24
1.3 LES GÈNES RÉGULATEURS DE L' APOPTOSE : MEMBRES DE LA FAMILLE DE BCL-2	25
1.3.1 STRUCTURE DES DIFFÉRENTS MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2	26
1.3.2 MÉCANISME DE RÉGULATION DES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2.....	26
1.3.3 RÉGULATION DE LA PERMÉABILITÉ MEMBRANAIRE MITOCHONDRIALE	29
1.4 LES CASPASES : EXÉCUTRICES CENTRALES DE L' APOPTOSE	31
1.4.1 STRUCTURE DES DIFFÉRENTES CASPASES	32
1.4.2 MÉCANISME D' ACTIVATION DES CASPASES	33
1.4.3 SUBSTRATS DES CASPASES	33
1.4.4 RÉGULATION DE L' ACTIVITÉ ET DU PROCESSUS DES CASPASES.....	35
1.5 APOPTOSE NUCLÉAIRE	38
1.5.1 LE DFF40 : FACTEUR DE FRAGMENTATION DE L' ADN.....	40
1.5.1.1 Molécules effectrices régulant le DFF40	42
1.6 L' IMPORTANCE DU TRANSPORT NUCLÉAIRE DANS L' APOPTOSE	44
1.6.1 LE TRANSPORT NUCLÉAIRE.....	45
1.6.2 ALTÉRATIONS DU TRANSPORT NUCLÉAIRE LORS DE L' APOPTOSE	48
1.6.3 LE COMPLEXE DFF ET LE TRANSPORT NUCLÉAIRE	49
1.7 IMPORTANCE DES MOLÉCULES DE STRESS DANS L' APOPTOSE	50
1.7.1 LES MAP KINASES P38, ERK ET JNK.....	50

1.7.2 LE PROTO-ONCOGÈNE AKT	51
1.7.3 LA PROTÉINE KINASE C δ	52
1.7.4 LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION NF- κ B.....	53
CHAPITRE 2: LE CD45 : IMPLICATION DANS L' APOPTOSE DES CELLULES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	55
2.1 INTRODUCTION.....	55
2.2 STRUCTURE ET ISOFORMES DU CD45.....	55
2.3 CASCADES DE SIGNALISATION VIA LE TCR : TRANSDUCTION DE SIGNAUX EN AVAL DU CD45	58
2.4 RÔLE DU CD45 CHEZ LES LYMPHOCYTES T.....	61
2.4.1 RÉGULATION DE LA FAMILLE SRC PAR LE CD45 CHEZ LES LYMPHOCYTES T	62
2.4.2 AUTRES MÉCANISMES DE RÉGULATION PAR LE CD45	65
2.5 RÉGULATION DE L' ACTIVITÉ DU CD45	66
2.6 IMPLICATION DU CD45 DANS L' APOPTOSE DES CELLULES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	68
2.6.1 INDUCTION DE L' APOPTOSE PAR LA LIAISON DU CD45 PAR DES ANTICORPS MONOCLONAUX.....	68
2.6.2 LA LIAISON DU CD45 PAR DES LIGANDS INDUIT L' APOPTOSE.....	70
2.6.3 IMPLICATION DU CD45 DANS L' INDUCTION DE L' APOPTOSE PAR LA VOIE DES RÉCEPTEURS DE MORT	73
2.6.4 IMPLICATION DU CD45 DANS L' APOPTOSE INDUITE PAR LA VOIE MITOCHONDRIALE.....	74
2.6.5 PARTICIPATION DU CD45 DANS L' APOPTOSE INDUITE PAR LE VIH	77
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE LA THÈSE.....	80
SECTION 2 : ARTICLES SCIENTIFIQUES	84
1.1 ARTICLE I	85
OBJECTIFS SPÉCIFIQUES DE L' ARTICLE I	86
CONTRIBUTIONS À L' ARTICLE	87
RÉSUMÉ FRANÇAIS	88
REGULATION OF DFF40 ACTIVITY IN T CELLS LOSING CD45 EXPRESSION.....	89
Abstract.....	90
Introduction.....	92
Materials and methods.....	97
Results	102
Discussion.....	110
Acknowledgments	116
Figure Legends	117
1.2 ARTICLE II.....	136
OBJECTIFS SPÉCIFIQUES DE L' ARTICLE II.....	137
CONTRIBUTIONS À L' ARTICLE	138
RÉSUMÉ FRANÇAIS	139
CD45 EXPRESSION ON HPB-ALL CELLS IS LINKED TO SIGNALING PATHWAYS.....	140
GOVERNING NUCLEAR APOPTOSIS.....	140
Abstract.....	141
Introduction.....	143
Materials and methods	147

Results	152
Discussion.....	160
Acknowledgments	166
Figure Legends	167
1.3 ARTICLE III	192
OBJECTIFS SPÉCIFIQUES DE L'ARTICLE III	193
CONTRIBUTIONS À L'ARTICLE	194
RÉSUMÉ FRANÇAIS	195
INVOLVEMENT OF TYROSINE PHOSPHATASE CD45 IN APOPTOSIS	196
Abstract.....	197
CD45 structure and isoforms	198
Role in the immune system cells	200
Regulation of CD45 activity.....	202
CD45 implication in apoptosis.....	204
Perspectives	218
References.....	224
DISCUSSION	237
CONCLUSION.....	251
PERSPECTIVES.....	254
ANNEXE I	258
ARTICLE SCIENTIFIQUE SUPPLÉMENTAIRE.....	259
CONTRIBUTIONS À L'ARTICLE	260
RÉSUMÉ FRANÇAIS	261
INVOLVEMENT OF CD45 IN DNA FRAGMENTATION IN APOPTOSIS INDUCED BY MITOCHONDRIAL PERTURBING AGENTS.....	262
ANNEXE II.....	279
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES.....	280
RÉFÉRENCES.....	289

Liste des figures

Figure 1 : Principales caractéristiques observées lors de l'apoptose, la nécrose, l'autophagie et la pyroptose.....	9
Figure 2 : Les divers mécanismes d'activation de l'apoptose	14
Figure 3 : Étape de la formation de l'apoptosome lors de l'induction de l'apoptose par la voie mitochondriale.....	16
Figure 4: Activation des caspases initiatrices par les récepteurs de mort.....	19
Figure 5 : Structure des principaux membres de la famille de Bcl-2	27
Figure 6 : Mécanisme d'activation des caspases	34
Figure 7 : Mécanisme de régulation du DFF40.....	43
Figure 8 : Structure du complexe du pore nucléaire.....	46
Figure 9 : Étapes du transport nucléaire	47
Figure 10 : Structure de l'isoforme CD45RABC et de l'isoforme CD45R0.....	57
Figure 11 : Voies de signalisation induite lors de la stimulation antigénique du TCR ...	60
Figure 12 : Régulation réciproque de la protéine tyrosine kinase p56lck par le CD45 et Csk	64
Figure 13: Événements caractérisant les cellules CD45- lors de l'induction de l'apoptose par un perturbateur mitochondrial	78
Figure 14 : Événements caractérisant les cellules CD45- après induction de l'apoptose par des agents perturbant la mitochondrie	253
Figure 15 : La pro-caspase-9 est clivée de façon similaire chez les cellules CD45+ et CD45-.....	281
Figure 16 : La pro-caspase-8 est clivée de façon similaire chez les cellules CD45+ et CD45-.....	282
Figure 17 : Les cellules CD45- sont résistantes à l'apoptose nucléaire induite par une variété d'inducteurs sauf suite à une exposition à la cycloheximide.....	283
Figure 18: La surexpression du complexe DFF n'induit pas de fragmentation de l'ADN chez les cellules CD45+ et CD45-.....	284
Figure 19 : Le niveau de phosphorylation de STAT1 est similaire chez les cellules CD45+ et CD45-.....	285
Figure 20 : Contrairement aux cellules CD45+, il y a augmentation de la synthèse d'ARN messenger durant l'exposition au TBT chez les cellules CD45-	286
Figure 21 : L'acétylation des histones est plus élevée chez les cellules CD45- comparativement aux cellules CD45+.....	287
Figure 22 : Les cellules CD45- sont résistantes à l'apoptose nucléaire suite à l'induction de l'apoptose par des inhibiteurs de HDAC	288

Liste des tableaux

Tableau I : Description des caractéristiques morphologiques et biochimiques spécifiques lors de l'apoptose et de la nécrose.	6
Tableau II : Principaux substrats des caspases.....	36

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	Facteur inducteur de l'apoptose « Apoptosis-inducing factor »
ANT	Translocateur à nucléotide adénine « Adenine Nucleotide Translocator »)
APAF-1	Facteur d'activation 1 des protéases apoptotiques « Apoptotic protease activating factor 1 »
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
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 »
BN-PAGE	« Blue Native-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis »
CAD	Désoxyribonucléase (DNase) activée par les caspases « Caspase-activated DNase »
CARD	Domaine de recrutement des caspases « Caspase recruitment domain »
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 »
CHOP	Protéine homologue à C/EBP « C/EBP homologous protein »
CK	Créatine kinase
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CPN	Complexe du pore nucléaire
CRADD	Domaine de recrutement des caspases « Caspase recruitment domain »
Csk	Kinase Src C-terminale « C-terminal Src kinase »
CycD	Matrice mitochondriale cyclophiline D « Cyclophilin D »
Da	Dalton
DAG	Diacylglycérol
dATP	Désoxy adénoside triphosphate

DD	Domaine de mort « Death domain »
DED	Domaine effecteur de mort « Death effector domain »
DFF35	Facteur de fragmentation de l'ADN 45 « DNA fragmentation factor 35 »
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 »
DNA-PK	Protéine kinase dépendante de l'ADN « DNA-dependent protein kinase »
DNase	Désoxyribonucléase
Ebp1	Protéine liant ErbB3-1 « ErbB3 binding protein 1 »
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 »
FLIP	Protéine inhibitrice de FLICE « FLICE-like inhibitory protein »
HDAC	Histones déacétylases
HMGB-1/2	Groupe des protéines à boîte à mobilité élevée 1/2 « High mobility group box 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
IP₃	Inositol 1,4,5-triphosphate
ITAM	Motifs d'activation de tyrosine du récepteur immunologique « Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs »

JAK	Janus kinase
JNK	Kinase c-Jun N-terminale « c-Jun N-terminal kinase »
kDa	Kilo Dalton
kpb	Kilo paires de bases
LCA	Antigène commun des leucocytes « Leukocyte common antigen »
LDL	Lipoprotéine de faible densité « Low density lipoprotein »
LPR	Protéine reliée au récepteur des LDL « Low density lipoprotein receptor-related protein 1 »
MAPK	Protéine kinase activée par des mitogènes « Mitogen-activated protein kinase »
NF-κB	Facteur nucléaire-κB « Nuclear factor-κB »
NLR	Domaine de liaison aux nucléotides, région de répétition riche en leucine « nucleotide-binding domain, leucine rich repeat »
NUP	Nucléoporine
PARP	Poly (ADP-ribose) polymérase
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3 phosphate
PK	Protéine kinase
PKC	Protéine kinase C
PLC-γ1	Phospholipase C-γ1
pb	Paire de bases
PBR	Récepteur à benzodiazépine périphérique « Peripheral benzodiazepine receptor»)
PS	Résidu 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 »
RE	Réticulum endoplasmique
RING	Gène nouveau très intéressant « Really interesting new gene »

RIP	Protéine interagissant avec les récepteurs « Receptor-interacting protein »
ROS	Espèces réactives oxygénées « Reactive oxygen species »
SCID	Immunodéficience combinée sévère « severe combined immunodeficiency »
SEN	Séquence d'exportation nucléaire
SH	Région d'homologie à Src « Src homology region »
SIDA	Syndrome d'immuno-déficience acquise
SLN	Séquence de localisation nucléaire
Smac	Seconde protéine mitochondriale activant les caspases « second mitochondria-derived activator of caspases »
TBT	Tributylétain
TCR	Récepteur des lymphocytes T « T cell receptor »
TNF	Facteur nécrosant des tumeurs « Tumor necrosis factor »
TNFR	Récepteur du TNF « TNF receptor »
TRADD	Protéine associée au récepteur du TNF avec un domaine de mort « TNF receptor-associated protein with death domain »
TUNEL	Marquage terminal in situ des coupures d'ADN « terminal dUTP nick-end labeling »
UPR	Réponse aux protéines mal repliées « unfolded protein response »
UV	Ultraviolet
VDAC	Canal anionique voltage-dépendant « Voltage-dependent anion channel »
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WD-40	Domaine de répétition « Repeat region »
ZAP-70	Protéine de 70 kDa associée aux chaînes zêta « Zeta chain-associated protein of 70 kDa »
$\Delta\Psi_m$	Potentiel membranaire mitochondrial

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, la libération du cytochrome c et du facteur inducteur de l'apoptose (AIF pour « Apoptosis-inducing factor »). Dans le cytosol, le cytochrome c forme un complexe multiprotéique 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. Dans la phase terminale de ce type de mort cellulaire, il y a l'apoptose nucléaire responsable de la condensation de la chromatine, la fragmentation internucléosomale de l'ADN et la désintégration du noyau. Lors de ces changements, la caspase-3 intervient dans les altérations nucléaires en clivant le facteur de fragmentation de l'ADN 45 (DFF45 pour « DNA fragmentation factor 45 »), la sous-unité inhibitrice du facteur de fragmentation de l'ADN 40, le DFF40 (DFF40 pour « DNA fragmentation factor 40 »). Le DFF40 est la principale endonucléase responsable de la fragmentation de l'ADN au cours de l'apoptose.

Le CD45 est une protéine tyrosine 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 tyrosine kinases p56lck et p59fyn, deux membres de la famille Src. Notre laboratoire a préalablement démontré l'implication du CD45 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 (CD45+), des lymphocytes T déficients pour l'expression du CD45 (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 activées dont la mobilisation du calcium intracellulaire, une réduction du potentiel membranaire mitochondrial, la libération du cytochrome c, l'activation de la caspase-3 et le clivage du DFF45. De plus, nous avons montré lors de l'isolation des différentes fractions cellulaires que la localisation nucléaire de la caspase-3 ainsi que celle du DFF40 sont perturbées.

À la suite de ces observations, le but de la présente étude était d'évaluer le rôle du CD45 dans l'apoptose nucléaire. Nous avons premièrement vérifié l'influence de l'expression du CD45 sur les mécanismes de régulation de l'apoptose nucléaire. Nous avons évalué les événements considérés essentiels dans l'induction de l'apoptose nucléaire dont la régulation du DFF40. Nous avons par la suite caractérisé les principales voies de signalisation en aval du CD45 et évalué l'implication de ces molécules dans des événements impliqués dans l'apoptose.

Cette thèse est divisée en deux sections. La première section comporte une revue de la littérature des connaissances actuelles concernant les sujets étudiés au cours de mon doctorat. Ce projet de doctorat est complémentaire aux études citées dans cette section sur la compréhension des mécanismes impliqués dans l'apoptose. Ces études visent à comprendre la régulation de l'apoptose nucléaire, qui est, à ce jour très peu connue. En premier lieu, les voies d'induction de l'apoptose, les gènes régulateurs de l'apoptose, les protéases nécessaires à l'exécution de cette mort cellulaire, l'endonucléase DFF40 ainsi que l'implication d'autres molécules dans l'apoptose seront présentées. En deuxième lieu, une description de la molécule du CD45 sera détaillée suivie du rôle de cette phosphatase dans le système immunitaire et de son implication dans l'apoptose. La deuxième section comprend l'ensemble des travaux effectués au cours de mon doctorat présentés sous la forme d'articles scientifiques. Cette section comprend également une revue sur l'implication du CD45 dans l'apoptose. Chacun des articles est précédé des objectifs spécifiques de l'article, de ma contribution comme auteure ainsi qu'une traduction française du résumé de l'article. Par la suite, une discussion analysera l'ensemble des résultats obtenus. L'annexe I comporte un article qui présente quelques uns de mes résultats obtenus lors de mon doctorat. Étant donné je ne suis pas la seule auteure

principale sur cet article, il a été présenté en annexe. Finalement, quelques résultats supplémentaires n'ayant pas été intégrés aux articles seront présentés dans l'annexe II.

SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE 1

MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE : L'APOPTOSE

1.1 Introduction

La survie de tout organisme multicellulaire implique un phénomène de mort cellulaire, d'autodestruction, pour se débarrasser naturellement des cellules nuisibles, endommagées, infectées, vieilles, en excès ou potentiellement dangereuses. À cette fin, il existe 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 et de l'homéostasie du développement normal des organismes (Hengartner, 2000). Le mot apoptose a été dérivé du grec et fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne; *apo* pour éloignement et *ptose* pour chute. Le terme apoptose était déjà utilisé par Hyppocrate de Cos (460-377 av. J.C.) pour décrire la décomposition post-mortem des corps. Toutefois, la découverte du processus de la mort cellulaire programmée a été effectuée 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).

1.1.1 L'apoptose versus la nécrose

Alors que la nécrose est un phénomène plutôt passif, dite une mort « accidentelle » survenant suite à une agression extérieure, l'apoptose est un processus actif et temporellement organisé. Les deux types de mort cellulaire se différencient par la cascade d'événements biochimiques les caractérisant. Le tableau I résume les différentes caractéristiques propres aux deux types de mort. 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

Tableau I : Description des caractéristiques morphologiques et biochimiques spécifiques lors de l'apoptose et de la nécrose. (Modifié de Mohamad *et al.*, 2005)

Apoptose	Nécrose
Caractéristiques morphologiques	
Bourgeonnement de la membrane plasmique	Perte de l'intégrité membranaire
Diminution du volume de la cellule	Gonflement de la cellule
Formation de corps apoptotiques	Lyse de la cellule
Absence de réponse inflammatoire	Réponse inflammatoire
Préservation du contenu lysosomal	Libération du contenu lysosomal
Caractéristiques biochimiques	
Requière de l'énergie, processus actif	Ne requière pas d'énergie, processus passif
Requière une synthèse macromoléculaire	Ne requière pas de synthèse macromoléculaire
Transcription de gènes <i>de novo</i>	Absence de transcription de gènes <i>de novo</i>
Fragmentation internucléosomale de l'ADN	Digestion de l'ADN aléatoire

l'environnement causant une réponse inflammatoire locale. La mort par nécrose se produit lorsque les cellules sont exposées à un événement qui est immédiatement létal comme une hyperthermie, une hypoxie, une ischémie, un poison métabolique ou un traumatisme cellulaire (Fadell, Orrenius et Zhivotovsky, 1999). Morphologiquement, le processus d'apoptose 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 condensation de la chromatine, un clivage de l'acide désoxyribonucléique (ADN) en fragments de haut poids moléculaire de 50 à 300 kilo paires de bases (kpb) et 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 étant donné que l'intégrité membranaire de la cellule est conservée et grâce à la phagocytose rapide des corps apoptotiques. Le processus de phagocytose par les macrophages et les cellules avoisinantes empêche également les cellules apoptotiques de mourir par nécrose secondaire. L'apoptose est donc une mort dite «discrète» ou «propre». Dépendamment du type et de l'intensité 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).

1.1.2 Autres types de mort cellulaire

Dans la dernière décennie d'autres types de mort cellulaire ont été identifiés. L'autophagie ou macroautophagie est caractérisée par la séquestration de matériels cytoplasmiques dans les autophagosomes pour leur dégradation par les lysosomes. L'autophagie peut être une voie de survie, mais lorsqu'un point de non retour est atteint la cellule est détruite. La mort cellulaire autophagie est morphologiquement caractérisée par une absence de la condensation de la chromatine et est accompagnée par une grande vacuolisation autophagique du cytoplasme (Scott, Juhasz et Neufeld, 2007; Kroemer *et al.*, 2009). Récemment, quelques études ont déterminé que la mort cellulaire par nécrose peut être finement régulée par des voies de signalisation et par des mécanismes

métaboliques. Le terme « nécroptose » a été proposé pour indiquer une mort par nécrose régulée au lieu d'accidentelle. Il a été démontré, entre autres, que des récepteurs de mort (TNFR1, Fas/CD95 et TRAIL-R) et des récepteurs du Toll-like (TLR3 et TLR4) peuvent provoquer ce type de mort et que cette induction serait dépendante de la kinase RIP1 (Festjens, Vanden Berghe et Vandenabeele, 2006; Holler *et al.*, 2000; Kroemer *et al.*, 2009). Une autre forme de mort cellulaire programmée est la cornification qui correspond aux dernières étapes de la différenciation dermique aboutissant à la desquamation. La cornification, également appelé kératinisation mène à la formation de cornéocytes, des kératinocytes morts contenant des protéines spécifiques comme de la kératine, des acides gras et des céramides nécessaires pour la formation de la couche de peau cornifiée. Le terme « anoikis » est le déclenchement de l'apoptose lors de la perte de l'attachement d'une cellule avec la matrice extracellulaire. Un autre type de mortalité est l'« entosis » où une cellule viable est phagocytée et meurt dans les phagosomes. Par contre, après être entrées certaines cellules peuvent encore se diviser et même en ressortir. Ce type de mort pourrait être un dernier recours lorsque d'autres types de mort sont défectueux, mais ce processus reste à être élucidé (Kroemer *et al.*, 2009). La pyroptose et la pyronécrose sont deux autres types de mort récemment identifiés. La pyroptose a premièrement été démontrée chez des macrophages infectés par *Salmonella typhimurium*. Il s'agit d'une mort cellulaire régulée par l'activation de la caspase-1, une protéase qui active également les cytokines pro-inflammatoires, dont l'interleukine-1 β (IL-1 β) et l'interleukine-18 (IL-18). La pyronécrose a également été identifiée comme étant une forme de mortalité en réponse à des pathogènes, observée entre autres chez des macrophages infectés par *S. flexneri*. La pyronécrose est indépendante des caspases, mais dépendante de l'activation des cathepsines et a des caractéristiques morphologiques semblables à la nécrose. Les protéines NLR avec un domaine de liaison aux nucléotides et une région de répétition riche en leucine (NLR pour « nucleotide-binding domain, leucine rich repeat ») émergent comme des molécules effectrices de ces deux derniers types de mort (Fink et Cookson, 2005; Ting, Willingham et Bergstralh, 2008). La figure 1 représente les types de mort cellulaire les plus connus, c'est-à-dire l'apoptose, la nécrose, l'autophagie et la pyroptose.

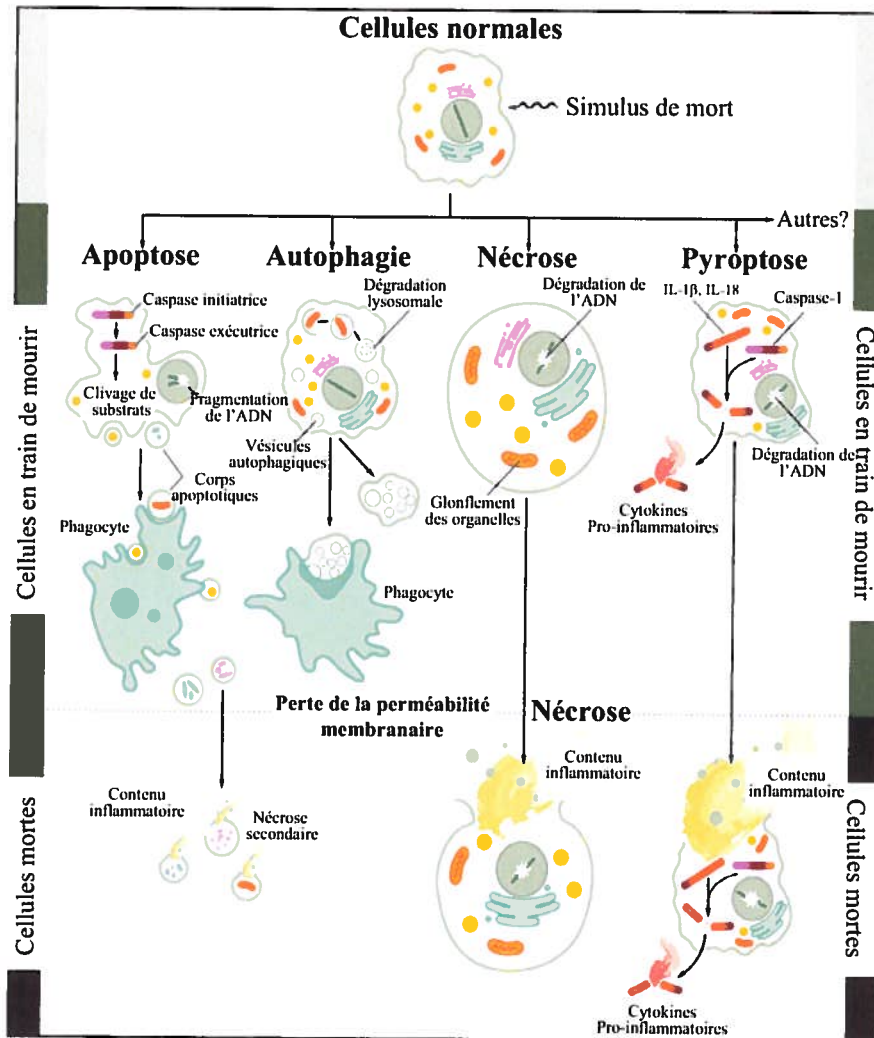


Figure 1 : Principales caractéristiques observées lors de l'apoptose, la nécrose, l'autophagie et la pyroptose. Les cellules apoptotiques détiennent une condensation du cytoplasme et de la chromatine, une fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotiques. L'absence de phagocytose mène les cellules à mourir par nécrose secondaire. L'autophagie se caractérise par une dégradation des composants cellulaires dans les vacuoles autophagiques de la cellule mourante. Les cellules autophagiques peuvent également être éliminées par les phagocytes. La nécrose est accompagnée par un gonflement cellulaire avec lyse de la membrane plasmique et libération dans le milieu environnant du contenu cytoplasmique induisant l'inflammation. La pyroptose est une voie d'activation de mort cellulaire régulée par la caspase-1, une protéase qui active également les cytokines pro-inflammatoires, IL-1 β et IL-18. Lors de la pyroptose il y a aussi une lyse cellulaire menant à une libération du contenu cellulaire pro-inflammatoire. (Modifié de Fink et Cookson, 2005)

1.1.3 La découverte de l'apoptose

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'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 (pour « Apoptotic protease activating factor 1 ») chez les mammifères et est une protéine formant l'apoptosome. Ced-4 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 homologue des membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Bergmann, Agapite et Steller, 1998; Del Peso *et al.*, 2000).

1.1.4 Importance de l'apoptose pour un équilibre harmonieux

L'apoptose fait partie intégrante des réactions physiologiques normales d'un bon nombre d'organismes allant des champignons aux mammifères, en passant par les plantes, les némathelminthes et les insectes. Chaque jour des milliards de nos cellules meurent par apoptose pour faire place à des cellules plus jeunes. L'apoptose est impliquée dans une multitude de fonctions physiologiques. Un exemple classique d'apoptose est dans la morphogenèse des doigts et des orteils au cours de laquelle les cellules de l'espace interdigital générées au début de l'embryogenèse vont être éliminées par apoptose (Tang *et al.*, 2000). L'apoptose est aussi un processus essentiel pour permettre à l'endomètre de

se détacher de l'utérus à chaque début des menstruations chez la femme (Harada *et al.*, 2007). Dans le système immunitaire l'apoptose est requise entre autres pour la sélection négative des thymocytes, c'est-à-dire pour l'élimination des thymocytes qui reconnaissent des peptides du soi (Rathmell et Thompson, 2002). Toute anomalie du processus de l'apoptose peut être à l'origine de nombreuses pathologies. Certaines perturbations sont liées à une inhibition de l'apoptose dont le cancer et des réactions d'auto-immunité. À l'opposé une trop grande stimulation du processus de l'apoptose mène à plusieurs pathologies dont une diminution du nombre des cellules CD4+ lors de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ainsi que des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Kam et Ferch, 2000; Thompson, 1995).

1.1.5 La phagocytose des cellules apoptotiques

L'élimination des cellules apoptiques par les phagocytes 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 sont normalement retenus au feuillet interne de la membrane (Meisenholder *et al.*, 1996). 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 des phospholipides perdue mène à l'apparition des PS sur le feuillet externe détectés par fixation de l'annexine V aux PS. Plusieurs récepteurs des phagocytes peuvent reconnaître les PS dont le récepteur de PS, le CD14, le CD36 et la protéine reliée au récepteur des LDL (LRP1 pour « Low density lipoprotein receptor-related protein 1 ») (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. De plus, 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).

1.2 Les différentes voies d'activation 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, la phase de régulation et la phase 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 des endonucléases (Ségal-Bendirdjian, 1999). Les caspases sont un groupe de protéases à cystéine impliquées dans l'apoptose et seront le sujet de discussion plus loin. L'apoptose peut être initiée principalement par deux voies, c'est-à-dire par la voie de la mitochondrie et la voie des récepteurs de mort. D'autres voies d'activation ont été démontrées comme la voie indépendante des caspases, la voie au stress du réticulum endoplasmique et la voie

sous la régulation de la p53 (Gottlieb, 1999). La figure 2 résume les voies d'activation de l'apoptose.

1.2.1 La voie intrinsèque mitochondriale

La mitochondrie est un organite clé, quasi incontournable, dans le processus apoptotique. La mitochondrie est reconnue comme un important organite intracellulaire pour sa production d'énergie, c'est-à-dire d'adénosine triphosphate (ATP). La mitochondrie a été établie comme étant le gardien de la mort cellulaire (Green et Reed, 1998; Green et Kroemer, 2004). En effet, la mitochondrie a un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose et la perturbation de son fonctionnement peut mener à une mort cellulaire par apoptose (Jeong et Seol, 2008). La majorité des voies apoptotiques passent par ce centre énergétique de la cellule. Toutefois, il existe des exceptions pour certains types cellulaires où l'activation de l'apoptose par un signal extrinsèque ne requière pas la mitochondrie. Lors de l'induction de l'apoptose, la mitochondrie subit des changements dont une chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) et une transition de sa perméabilité. Ces événements sont régulés, entre autres, par des protéines mitochondriales, les membres de la famille de Bcl-2. Lors de la transition de la perméabilité de la mitochondrie, il y a libération dans le cytosol de nombreux facteurs pro-apoptotiques qui étaient confinés au niveau de l'espace intermembranaire de cette organelle et qui sont nécessaires à la propagation du signal apoptotique (Ashe et Berry, 2003).

Plusieurs facteurs peuvent induire l'apoptose par une perturbation de la mitochondrie. Parmi ceux-ci, on retrouve des drogues de chimiothérapie, des xénobiotiques et des agents induisant des dommages à l'ADN (Loeffler et Kroemer, 2000). Lors d'une perturbation de la mitochondrie, le cytochrome c, normalement confiné dans l'espace intermembranaire, est libéré et induit l'assemblage de l'apoptosome. En effet, dans le cytosol, le cytochrome c interagit en présence d'ATP ou de dATP (désoxy adénosine triphosphate) avec APAF-1 et la pro-caspase-9 pour former l'apoptosome (Ashe et Berry, 2003). L'apoptosome est un complexe heptamérique constituée de 7 molécules APAF-1, 7 molécules de cytochrome c et 7 molécules de caspase-9 qui forme une structure

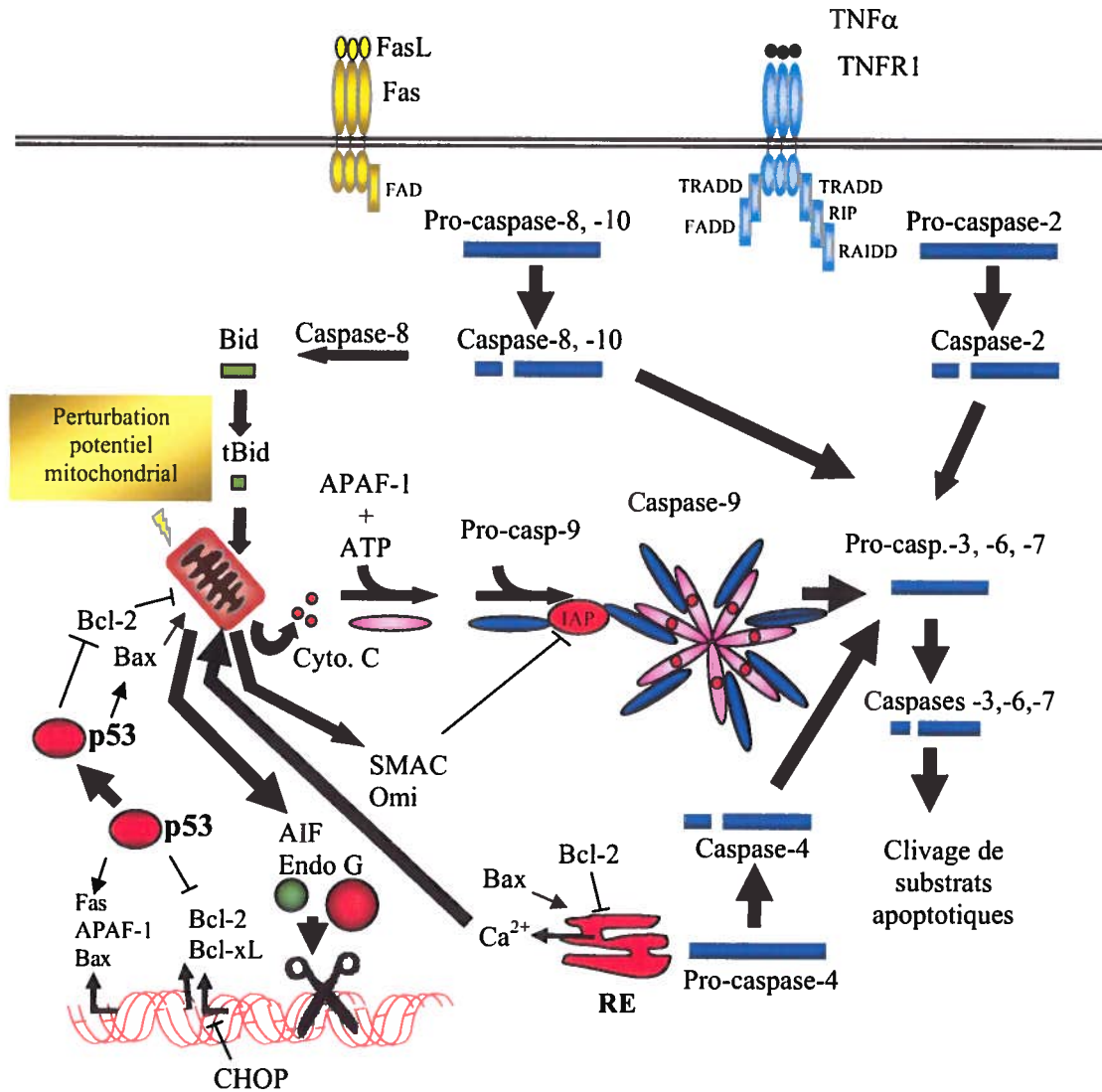


Figure 2 : Les divers mécanismes d'activation de l'apoptose. Activation de l'apoptose par les différentes voies: la voie de la mitochondrie, la voie des récepteurs de mort, la voie indépendante des caspases, le stress au niveau du réticulum endoplasmique et la régulation par p53.

ressemblant à une roue (Hill, Adrain et Martin, 2003; Kim *et al.*, 2005) (Figure 3). La molécule APAF-1, une protéine de 130 kDa, est formée d'un domaine de recrutement de caspases, CARD, (pour « caspase recruitment domain ») à sa région N-terminale et de deux domaines 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 empêchent l'action inhibitrice du domaine WD-40 pour permettre l'oligomérisation de la molécule APAF-1 (Lauber *et al.*, 2001). Subséquemment, le domaine CARD de APAF-1 interagit avec le domaine CARD de la pro-caspase-9 (Hu *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1999). La pro-caspase-9 associée au complexe subit un changement de conformation et il y a dimérisation. La caspase-9, maintenant enzymatiquement active, permet à son tour l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7. Cette cascade d'activation conduit à la destruction de la cellule par une protéolyse. Les molécules Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 sont également libérées dans le cytosol par la mitochondrie lors d'un stimulus apoptotique. Ces molécules se lient au domaine de répétition IAP baculoviral, BIR (pour « Baculoviral IAP repeat »), des protéines inhibitrices de l'apoptose nommées IAP (pour « Inhibitor of apoptosis protein »). Cette liaison permet d'enlever l'action inhibitrice des protéines IAP sur les caspases (Verhagen et Vaux, 2002). L'Omi/HtrA2, une sérine protéase, peut également cliver les protéines IAP pour favoriser l'apoptose (Yang *et al.*, 2003).

1.2.2 La voie extrinsèque des récepteurs de mort

La seconde voie menant à l'apoptose implique une famille de récepteurs spécialisés dans l'induction de la mort cellulaire programmée, les récepteurs de mort. Ces récepteurs sont des protéines membranaires auxquelles vont se lier des ligands spécifiques. Ces récepteurs de mort cellulaire appartiennent à la superfamille des récepteurs du facteur nécrosant des tumeurs, TNFR (pour « Tumor necrosis factor receptor »). Les principaux membres de la famille du TNFR impliqués dans la mort cellulaire sont TNFR1 (ou DR1, p55, p60, CD120a), CD95 (ou Fas, DR2, APO-1), DR3 (ou Apo 3, WSL-1, TRAMP, LARD), DR4 (ou TRAIL-R1, APO-2), DR5 (ou TRAIL-R2, TRICK-2, KILLER) et DR6 (Ashkenazi et Dixit, 1998; Gloire, Charlier et Piette, 2008). La famille des ligands du

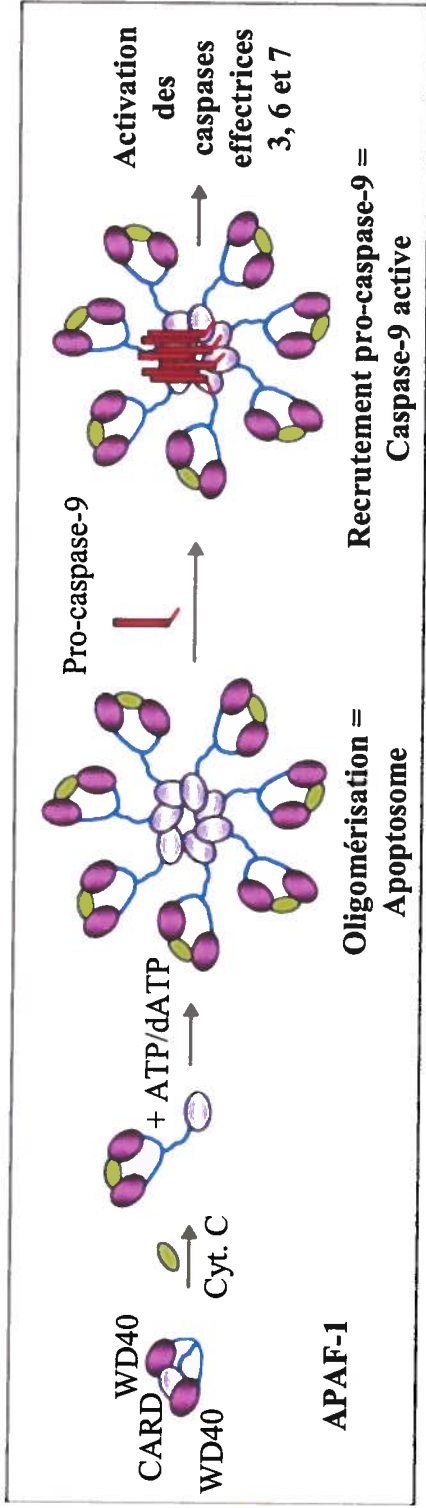


Figure 3 : Étape de la formation de l'apoptosome lors de l'induction de l'apoptose par la voie mitochondriale. Lors d'une perturbation de la mitochondrie, le cytochrome c est libéré et va induire l'assemblage de l'apoptosome. Dans le cytosol, en présence d'ATP ou de dATP, le cytochrome c interagit premièrement avec la molécule APAF-1 en enlevant l'action inhibitrice des domaines WD-40 de APAF-1. Subséquemment, le domaine CARD de APAF-1 permet d'interagir avec le domaine CARD de la pro-caspase-9. La pro-caspase-9 associée au complexe va subir un changement de conformation et une dimérisation. La caspase-9 enzymatiquement active permet à son tour l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7 conduisant à la destruction de la cellule par une signalisation protéolytique.

(Modifié de Ségal-Bendirdjian *et al.*, 2005)

TNFR comprend une quinzaine de membres dont : FasL liant Fas; le TNF et la lymphotoxine α liant TNFR1; l'Apo 3L liant DR3; l'Apo 2L liant DR4 et DR5. Le domaine extracellulaire de ces ligands est formé d'environ 150 acides aminés et possède de 20 à 25 % d'homologie avec la famille du TNFR (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, dans la portion cytoplasmique, une région conservée appelée domaine de mort, DD (pour « death domain »). Par l'intermédiaire d'une 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 de mort conduit à leur oligomérisation permettant le recrutement de protéines adaptatrices qui s'associent aux DD par l'intermédiaire de leurs propres DD (Ashe et Berry, 2003).

Le récepteur de mort le plus connu est le récepteur Fas. Le ligand de Fas, FasL, existe sous une forme trimérique à la surface des cellules et sous une forme soluble. Lors de la stimulation de Fas par FasL, sa trimérisation permet le recrutement d'une protéine adaptatrice nommé FADD (pour « Fas-associated protein with death domain ») par l'intermédiaire de son domaine de mort. Le FADD présente la particularité de posséder, en plus de son DD, un domaine effecteur de mort cellulaire, DED, (pour « death effector domain ») dans sa région N-terminale. Par le domaine DED, FADD recrute à son tour les pro-caspases initiateuses 8 et 10. L'ensemble de ces protéines forme, avec le récepteur, un complexe de signalisation induisant la mort nommé DISC. Une fois les pro-caspases initiateuses recrutées, elles sont clivées les rendant ainsi actives. Il en résulte une activation séquentielle de caspases qui clivent des substrats qui étaient essentiels à la survie de la cellule (Depraetere et Golstein, 1997). Les autres membres de la famille du TNFR, à l'exception de TNFR1, s'active similairement. Pour le TNFR1, il y a sa trimérisation résultant de la fixation de son ligand ce qui permet le recrutement d'une molécule adaptatrice, une protéine associée au récepteur du TNF avec un domaine de mort, TRADD (pour « TNF receptor-associated protein with death domain »). Cette molécule associée au TNFR1 par son DD, recrute à son tour FADD et la pro-caspase-8 ou -10 (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 (pour « receptor interacting protein ») 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 par l'interaction de son domaine DD avec une protéine homologue à ICH-1/Ced-3 associée à la protéine RIP avec un domaine de mort, RAIDD (pour « RIP-associated ICH-1/Ced-3 homologous protein with death domain ») et avec la protéine adaptatrice de RIP avec un domaine de mort, CRADD (pour « Caspase recruitment domain »). La protéine RAIDD contient un domaine 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 domaines DD, DED ou CARD dans des interactions du type FADD / caspase-8, -10; TRADD / FADD / caspase-8, -10 et TRADD / RIP / RAIDD / caspase-2 (Figure 4).

1.2.2.1 Régulation 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. Par exemple, la phosphatase associée à Fas 1, FAP-1 (pour « Fas-associated phosphatase-1 »), une tyrosine phosphatase, inhibe l'apoptose initiée par Fas en se liant aux 15 derniers acides aminés de la partie intracellulaire de Fas. L'interaction de FAP-1 avec Fas 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). La protéine DAXX, quand à elle, se lie plutôt au DD cytosolique du récepteur Fas et active la voie de signalisation des Jun kinases (JNK pour « c-Jun N-terminal kinase »), augmentant l'induction de l'apoptose (Yang *et al.*, 1997). La protéine FLASH, qui fait partie intégrante du complexe DISC associé au récepteur Fas, est nécessaire à l'activation de la caspase-8 suite à une stimulation du récepteur (Imai *et al.*, 1999). Lors de l'apoptose induite par le TNFR1, Toso, un membre de la superfamille des immunoglobulines, possède la capacité de bloquer cette induction de l'apoptose. 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).

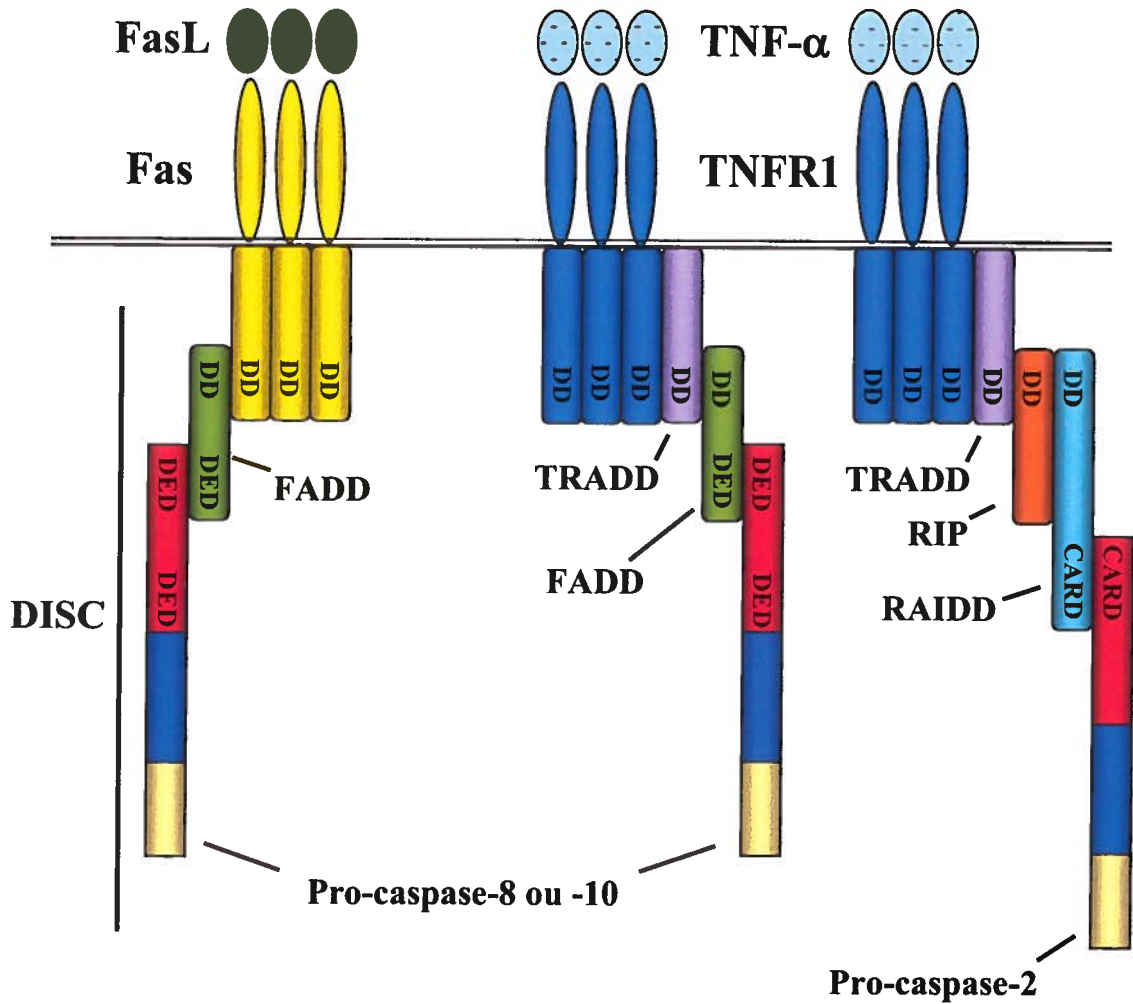


Figure 4: Activation des caspases initiateuses par les récepteurs de mort. Lors de l'engagement des ligands aux récepteurs de mort, les récepteurs subissent un changement de conformation. Ce changement de conformation permet le recrutement de molécules à l'aide des domaines DD et DED, ce qui permet la formation du DISC. La formation du DISC mène à l'activation des caspases initiateuses 8, 10 ou 2. (Adapté de Rathmell et Thompson, 1999; Tchikov et Schneider-Brachert, 2008)

1.2.2.2 Communication avec la voie mitochondriale

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, la formation du DISC est très efficace et il y a production d'une quantité massive de caspase-8 active et aucun signal d'amplification n'est nécessaire (Algeciras-Schimmich *et al.*, 2002; Ashe et Berry, 2003). La caspase-8 active à son tour les caspases effectrices et la phase effectrice de l'apoptose. L'apoptose des cellules de type I est accompagnée d'une perturbation de la mitochondrie et de la libération 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 qui régulent la perméabilité mitochondriale, démontrant la non nécessité de l'activation de la voie mitochondriale (Scaffidi *et al.*, 1998). Chez les cellules de type II, la formation du DISC est inefficace et peu de caspase-8 sont produites rendant le recrutement de signaux intracellulaires impliquant la mitochondrie nécessaire (Scaffidi *et al.*, 1999b). En effet, la caspase-8 clive la protéine Bid, un membre pro-apoptotique de la famille de Bcl-2. La forme tronquée de Bid induit la libération du cytochrome c et de DIABLO de la mitochondrie, activant la voie mitochondriale (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-Schimmich *et al.*, 2002). Les cellules neuronales semblent être de type II, mais ce classement reste à être confirmé (Yin *et al.*, 2002; Ashe et Berry, 2003).

1.2.3 La voie indépendante des caspases

Le démantèlement de la cellule lors de l'apoptose est principalement effectué par les caspases. Malgré le rôle bien établi des caspases, l'apoptose peut avoir lieu indépendamment de celles-ci. L'apoptose indépendante des caspases est effectuée par le facteur AIF et l'endonucléase G qui sont transloqués de la mitochondrie au noyau lors d'un stress apoptotique (Tait et Green, 2008). Contrairement au cytochrome c, à

Smac/Diablo ou à HtrA2/Omi, la libération d'AIF et de l'endonucléase G de l'espace intermembranaire de la mitochondrie ne conduit pas à l'activation des caspases. La AIF est une flavoprotéine capable à elle seule d'induire une condensation de la chromatine ainsi qu'une fragmentation de l'ADN en haut poids moléculaire (50 kpb) (Ashe et Berry, 2003; Van Gurp *et al.*, 2003). Les mécanismes moléculaires par lesquels la AIF exerce son activité cytotoxique restent encore à être clarifiés puisqu'elle ne possède pas d'activité nucléase. L'endonucléase G est la nucléase prédominante au niveau de la mitochondrie et elle pourrait avoir un rôle dans la régulation de la biogenèse mitochondriale, la synthèse et la réparation de l'ADN (Tait et Green, 2008). L'endonucléase G peut également quitter l'espace intermembranaire mitochondrial en situation d'apoptose pour gagner le noyau où elle est impliquée dans la fragmentation de l'ADN. Cette nucléase digère l'ADN en fragments de haut poids moléculaire et en fragments internucléosomales de faible poids moléculaire (Widlak et Garrard, 2005). La molécule AIF et l'endonucléase G semblent réguler l'apoptose par un mécanisme indépendant des caspases, mais ils sont toutefois relargués en même temps que les autres facteurs mitochondriaux pro-apoptotiques qui activent les caspases. Ces protéines procèdent donc indépendamment des caspases, mais agissent en coopération pour la promotion de l'apoptose nucléaire.

1.2.4 Le stress au niveau du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite cytoplasmique qui peut également avoir un rôle dans l'induction de l'apoptose. Le RE est un réservoir à calcium et intervient dans la rétention du calcium intracellulaire et dans le maintien de l'homéostasie calcique. Cet organite est également l'endroit où les protéines et les lipides sont synthétisés et modifiés. Entre autres, la glycosylation des protéines se fait dans le RE. Étant donné qu'un grand nombre de protéines sont présentes dans le RE, ce compartiment est riche en molécules chaperonnes pour contrôler le repliement de ces protéines. La majorité des protéines sécrétées et membranaires sont synthétisées dans le RE où elles sont repliées et assemblées avant d'être transportées vers la surface cellulaire, vers les lysosomes ou vers l'appareil de Golgi (Faitova *et al.*, 2006). La maturation des protéines commence dans le

RE et se termine dans l'appareil de Golgi. Le rôle du RE dans le stress cellulaire est maintenant connu depuis quelques années. Dans diverses conditions cellulaires induisant un stress au niveau du RE, des protéines de conformation anormale s'accumulent dans le RE et induisent la réponse UPR (Réponse aux protéines mal repliées « Unfolded protein response »). Les différents stress au niveau du RE incluent l'hypoxie, la privation de nutriments, un changement au niveau du pH, l'inhibition de la glycosylation des protéines, la réduction de la formation des ponts disulfures, la chute du calcium intra-RE ou le blocage du transport des protéines du RE à l'appareil de Golgi (Heath-Engel, Chang et Shore, 2008; Faitova *et al.*, 2006). Lors de ces stress, les protéines s'accumulent et s'agrègent dans le RE. La réponse UPR a pour but de diminuer la synthèse générale des protéines et d'induire la synthèse de molécules chaperonnes et dans certains cas la libération de calcium et d'un stress oxydant (Kaufman, 1999). Lorsque le stress au niveau de RE persiste, il y a enclenchement de l'apoptose de la cellule. L'apoptose causée par le mauvais repliement de protéines au niveau du RE est responsable de plusieurs pathologies dont les maladies de Parkinson, de l'Alzheimer et de Huntington où l'apoptose induit une dégénérescence neurologique (Mattson, 2000). La régulation de l'apoptose par le RE est mal connue. Par contre, depuis quelques années le mécanisme d'activation de l'apoptose par le RE a commencé à être plus étudié. Lors de stress au niveau du RE, trois signaux d'activation de l'apoptose ont été proposés (Faitova *et al.*, 2006), à savoir :

(i) Le premier signal implique le facteur de transcription CHOP (protéine homologue à C/EBP/ « C/EBP homologous protein »)/GADD153. CHOP est un membre de la famille des régulateurs transcriptionnels C/EBP, un inhibiteur dominant négatif de C/EBP (Ron et Habener, 1992). Suite à un stress, une surexpression de CHOP provoque l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Wang *et al.*, 1996). CHOP est un facteur de transcription qui réprime le promoteur de Bcl-2 et sensibilise la mitochondrie aux effets pro-apoptotiques de certains membres de la famille de Bcl-2. L'apoptose en réponse à un stress au niveau du RE est grandement diminuée chez des souris déficientes pour l'expression de CHOP, suggérant que le facteur de transcription CHOP joue un rôle important dans ce processus (Oyadomari *et al.*, 2002).

(ii) Le deuxième signal met en jeu la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction, eIF-2 α . Lors de l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE, la réponse immédiate est au niveau de l'inhibition de la traduction de protéines. Lors de cette diminution de la synthèse protéique, eIF-2 α devient phosphorylé et inhibe toute initiation de la traduction de protéines. L'activation de eIF-2 α joue également un rôle important dans l'activation du facteur de transcription CHOP (Kaufman, 1999; Prostko *et al.*, 1992).

(iii) Le troisième mécanisme implique l'activation des caspases. La caspase-12 est localisée dans les membranes du RE et participe à l'apoptose induite lors d'un stress au niveau du RE. Après l'initiation de l'apoptose, la pro-caspase-12 est clivée et devient active par un mécanisme encore peu connu (Nakagawa *et al.*, 2000). Toutefois, quelques études ont rapporté que l'activation de la pro-caspase-12 se ferait par les calpaïnes ou par la translocation de la caspase-7 dans le RE (Nakagawa et Yuan, 2000; Rao *et al.*, 2001b). La protéine TRAF2, préalablement recrutée par la protéine Ire1, pourrait également favoriser l'oligomérisation de la caspase-12. TRAF2 activerait donc la caspase-12 par clivage protéolytique (Yoneda *et al.*, 2001). Il a été proposé que la caspase-12 pourrait par la suite directement activer la caspase initiatrice 9 indépendamment du cytochrome c et de APAF-1 (Rao *et al.*, 2002b). La caspase-12 étant rarement exprimée chez l'humain, il a été proposé que la caspase-4 humaine serait l'homologue de la caspase-12 chez la souris (Hitomi *et al.*, 2004).

La libération de calcium provenant du RE dans le cytosol est un phénomène déclenchant l'apoptose (Pinton *et al.*, 2008). La libération de calcium dans le cytosol permet d'activer des enzymes calcium-dépendantes dont certaines endonucléases. Une quantité excessive de calcium au niveau de la mitochondrie provoque l'apoptose en stimulant la libération des protéines apoptogènes et en produisant des espèces réactives oxygénées, ROS (pour « Reactive oxygen species ») (Smaili *et al.*, 2003). Il est aussi à noter que des membres de la famille de Bcl-2 ont été observés à la surface du RE. L'apoptose lors d'un stress au niveau du RE peut donc être régulée d'une façon dépendante du calcium par les membres de la famille de Bcl-2, en augmentant la perméabilité membranaire (Heath-Engel, Chang

et Shore, 2008). La formation d'un pore au niveau de la membrane du RE par Bax et Bak, deux membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, permettrait la libération de calcium (Nutt *et al.*, 2002).

1.2.5 Le gène suppresseur de tumeur p53 et l'apoptose

Le gène suppresseur de tumeur p53 code pour une phosphoprotéine de 53 kDa, décrite comme le gardien du génome. La p53 peut initier la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, mais également l'apoptose (Vasquez *et al.*, 2008). Le gène de la p53 est altéré dans plus de 50 % des cancers humains démontrant son rôle dans la suppression de tumeurs (Hollstein *et al.*, 1991). Ce rôle de suppression des tumeurs est effectué en induisant l'apoptose. La p53 est activée lors d'un stress cellulaire dont par de l'hypoxie, des signaux de prolifération anormaux comme l'activation d'oncogènes et principalement suite à des dommages à l'ADN (Vasquez *et al.*, 2008). Dans des cellules et tissus normaux, la p53 a une demi-vie courte et est donc rapidement dégradée. La protéine MDM2 régule la dégradation de p53 en se fixant sur cette dernière, ce qui favorise l'ajout de groupement d'ubiquitine favorisant ainsi sa dégradation par le protéasome. MDM2 inhibe également l'activité de transactivation de la p53. Fait intéressant, p53 régule son propre niveau d'expression par la régulation de l'expression de MDM2. Suite à un stress, p53 devient phosphorylée bloquant son interaction avec MDM2 et inhibant sa dégradation par le protéasome (Chumakov, 2007). En réponse à des dommages à l'ADN, p53 peut être phosphorylée par plusieurs kinases dont ATR, ATM, CHK1/CHK2 et DNA-PK (pour « DNA-dependent protein kinase ») (Horn et Vousden, 2007). Par la suite, la p53 subit un changement de conformation résultant de différentes modifications post-traductionnelles dont sa phosphorylation, sa déphosphorylation, sa sumoylation et son acétylation. Ces derniers changements au niveau de la p53 active son rôle de facteur de transcription (Caspari, 2000; Salles-Passador, Fotedar et Fotedar, 1999; Bartek et Lukas, 2003). Une fois activé, p53 va augmenter ou inhiber certains gènes pour induire l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de dommages à l'ADN ou l'apoptose. Les gènes régulés vont déterminer le devenir de la cellule. Donc, une accumulation de p53 ne conduit pas forcément à l'apoptose.

Le rôle de p53 dans l'apoptose n'est pas aussi bien connu contrairement à ses fonctions de régulation du cycle cellulaire et de réparation de l'ADN. Par contre, il est établi que l'induction de l'apoptose par la p53 peut être dépendante de son activité comme facteur de transcription ou indépendante de celle-ci (Chipuk et Green, 2006). La protéine p53 stabilisée, s'accumule dans le noyau pour augmenter l'expression de gènes pro-apoptotiques dont Fas, APAF-1, DR5 et des membres de la famille de Bcl-2 (PUMA, Noxa, Bax) et inhiber l'expression de certains gènes anti-apoptotiques dont des membres de la famille de Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL). Outre son rôle de facteur de transcription, après sa localisation au niveau de la mitochondrie, p53 peut également induire l'apoptose par son habilité à se lier directement à des membres anti-apoptotiques de Bcl-2 (Bcl-2 et Bcl-xL) pour ainsi activer des membres pro-apoptotiques de cette famille (Bax et Bak). Ces interactions mènent à la libération du cytochrome c de la mitochondrie et entraînent l'activation de la voie apoptotique mitochondriale (Chipuk et Green, 2006; Vousden et Lu, 2002). La voie des récepteurs de mort peut également être activée par l'augmentation de l'expression de PIDD. L'expression de cette protéine est médiée par p53. PIDD est le composant principal du PIDDosome. Le PIDDosome est un complexe multiprotéique composé de PIDD, de la caspase-2 et de la protéine RAIDD. Ce complexe permet d'amplifier l'initiation de l'apoptose. Les co-facteurs composant le PIDDosome ne sont malheureusement pas encore tous identifiés. De plus, le mécanisme par lequel le PIDDosome active la caspase-2 n'est pas encore éclairci (Tinel et Tschopp, 2004; Bao et Shi, 2007).

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 de la cellule. Le premier membre de la famille à avoir été identifié est Bcl-2, identifié comme proto-oncogène dans les lymphomes B folliculaires (Bcl pour « B cell lymphoma ») (Tsujimoto et Croce, 1986). Il a été démontré que cet oncogène n'activait pas la prolifération cellulaire, mais était plutôt responsable de l'inhibition de l'apoptose (Hockenbery *et al.*, 1990). Bcl-2 et ses homologues fonctionnels sont essentiels à la régulation de la cellule chez plusieurs

espèces. Cette famille de protéines est conservée depuis plus d'un milliard d'années où un bon exemple est l'expression de Ced-9, l'homologue de Bcl-2 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Hengartner et Horvitz, 1994). Chez les mammifères, les virus ont évolué en codant des homologues anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 déjouant ainsi la machinerie apoptotique et démontrant l'ampleur du rôle de ces protéines dans l'apoptose (Cheng *et al.*, 1997; Chung, Sheu et Yen, 2003).

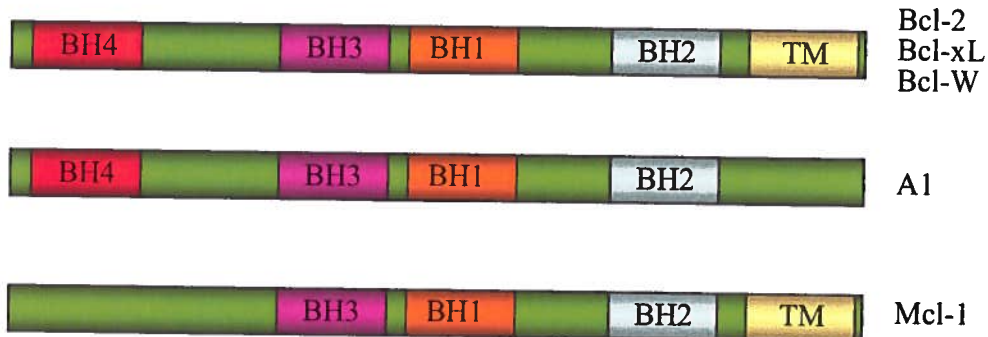
1.3.1 Structure des différents membres de la famille Bcl-2

Chez les mammifères, les membres de Bcl-2 possèdent tous une région structurale d'homologie à Bcl-2 appelée BH (pour « Bcl-2 Homology region »). Quatre domaines BH ont été identifiés c'est-à-dire BH1, BH2, BH3 et BH4. De plus, plusieurs membres détiennent un domaine d'ancrage à la membrane (Wong et Puthalakath, 2008). Le premier groupe de cette famille est composé des membres anti-apoptotiques incluant Bcl-2, A1/Bfl-1, Bcl-w, Bcl-xL, Boo/Diva et Mcl-1. Ces protéines contiennent trois ou quatre domaines BH où le domaine BH4 est requis pour la fonction anti-apoptotique de Bcl-2 et Bcl-xL (Huang, Adams et Cory, 1998). Le deuxième groupe est composé des membres pro-apoptotiques à domaine multiple incluant Bax, Bak et Bok qui possèdent les domaines BH1, BH2 et BH3 et qui détiennent des similitudes structurales avec les protéines anti-apoptotiques. Le dernier groupe est composé de membres pro-apoptotiques qui détiennent seulement une région courte, c'est-à-dire le domaine BH3 dont, entre autres, Bad, Bcl-xS, Bik/Nbk, Bid, Bim/Bod, Hrk/DP5, Blk, Bmf, Bcl-GS, Noxa et PUMA/Bbc3 (Adams et Cory, 2001; Tsujimoto, 2003; van Delft et Huang, 2006; Wong et Puthalakath, 2008). La figure 5 schématise la structure des principaux membres de la famille de Bcl-2.

1.3.2 Mécanisme de régulation des membres de la famille Bcl-2

Les membres de la famille de Bcl-2 sont localisés au niveau du cytoplasme, de la membrane mitochondriale externe, du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire (Borner, 2003). Les membres qui détiennent un domaine transmembranaire sont

Anti-apoptotiques



Pro-apoptotiques

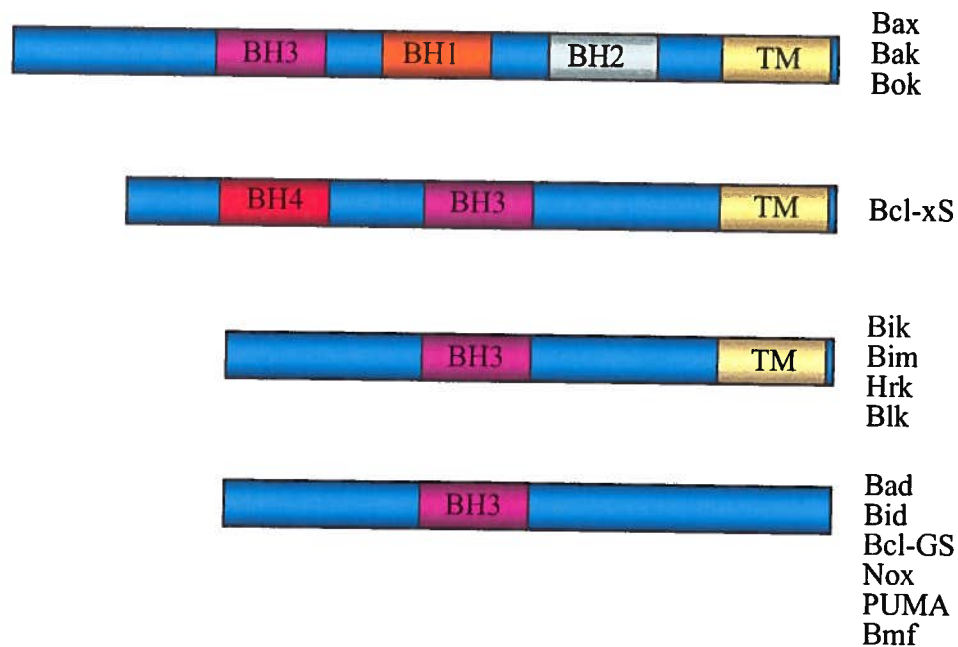


Figure 5 : Structure des principaux membres de la famille de Bcl-2. La famille Bcl-2 est séparée en deux groupes. Le premier groupe de cette famille est composé de membres anti-apoptotiques contenant trois ou quatre domaines BH. Le deuxième groupe est composé de membres pro-apoptotiques à domaine multiple et qui détiennent des similitudes structurales avec les protéines anti-apoptotiques. Le dernier groupe est composé de membres pro-apoptotiques qui détiennent seulement une région courte, c'est-à-dire le domaine BH3. Les membres de la famille de Bcl-2 diffèrent selon le nombre de domaine BH et d'un domaine transmembranaire. (Adapté de Danial, 2007)

ancrés à la surface des membranes par cette 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 en bloquant 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 sont essentiels pour compléter le processus d'apoptose dans plusieurs systèmes (Lindsten *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2002).

La modulation de la perméabilité membranaire mitochondriale par les membres de la famille de Bcl-2 mène à la libération de molécules dans le cytosol dont le cytochrome c qui conduit à la formation de l'apoptosome et l'induction de l'apoptose. Le mécanisme de régulation des membres de la famille de Bcl-2 est diversifié. Il inclut le contrôle de la transcription, des modifications post-traductionnelles, la translocation de protéines, le clivage protéolytique et des interactions entre protéines (Borner, 2003; Wong et Puthalakath, 2008). Il semble cependant que la clé de la régulation réside dans la capacité de ces protéines à former des homodimères et des hétérodimères. Le processus décisionnel entre la survie et la mort serait régulé par le type et la proportion de dimères anti- et pro-apoptotiques (Oltvai *et al.*, 1993; Suzuki, Youle et Tjandra, 2000). Les domaines BH1, BH2 et BH3 permettent de s'associer avec un domaine BH3 d'une autre protéine. Le domaine BH4 peut être phosphorylé ce qui régule l'association entre les protéines. Les homodimères anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL 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-xL par l'intermédiaire de leur domaine BH3 et inhiber leur activité protectrice (Sattler *et al.*, 1997; Zha *et al.*, 1996a). Les membres pro-apoptotiques qui ne comportent qu'un seul domaine BH3, comme Bad ou Bid, ne peuvent pas former d'homodimères et ne possèdent pas d'activité intrinsèque. Leurs rôles pro-apoptotiques impliquent la formation d'hétérodimères avec des membres anti-apoptotiques réduisant ainsi la capacité de ceux-ci à former des homodimères protecteurs (Petros, Olejniczak et Fesik, 2004).

En plus de leur capacité à former des dimères, l'activité des protéines de la famille de Bcl-2 peut être également modulée par des modifications post-traductionnelles. L'exemple le plus caractéristique de ce type de régulation est la phosphorylation de Bad. Chez des cellules hématopoïétiques en présence de facteurs de croissance, 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 cytokines à leurs récepteurs activant ainsi la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) qui phosphoryle Akt/PKB qui à son tour phosphoryle Bad (Zha *et al.*, 1996b). En absence de facteurs de croissance, Bad est déphosphorylé et peut donc se libérer des protéines de la famille 14-3-3. Bad peut ainsi interagir avec Bcl-xL et bloquer son action protectrice (Kelekar *et al.*, 1997; Zha *et al.*, 1997). Le membre bcl-2 est également une phosphoprotéine. Toutefois, la régulation de la phosphorylation de Bcl-2 et le rôle de cette phosphorylation restent incertains. Il a été proposé que l'hyperphosphorylation de Bcl-2 serait associée à l'apoptose, tandis que la phosphorylation sur un seul site, c'est-à-dire sur sérine 70, serait associée à un signal de survie (Ruvolo, Deng et May, 2001).

1.3.3 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 l'espace 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 anioniques voltage-dépendants (VDAC pour « Voltage-dependent anion channel »), le translocateur à nucléotide adénine (ANT pour « Adenine nucleotide translocator »), le récepteur à benzodiazépine périphérique (PBR pour «

Peripheral benzodiazepine receptor») et la matrice mitochondriale cyclophiline D (CycD pour « Cyclophilin D »). 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). Trois modèles de l'ouverture des PTP ont été proposés (Adams et Cory, 2001; Ashe et Berry, 2003; Tsujimoto, 2003).

(i) Suite à leur insertion dans la membrane, les membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 forment des canaux facilitant le transport de protéines. Cette théorie est basée sur les similitudes structurales entre la protéine Bcl-xL et la toxine diphtérique capable de former des pores dans la membrane d'une cellule.

(ii) Les membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 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 VDAC, au niveau de la membrane externe de la mitochondrie pour former un pore.

(iii) Les membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 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 molécules.

Les membres pro-apoptotiques de Bcl-2, Bax et Bak semblent avoir un rôle important dans des PTP soit par le résultat d'une oligomérisation de Bax et Bak ou par l'assemblage du PTP (Danial et Korsmeyer, 2004; Danial, 2007). 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 des membres de Bcl-2 serait de stabiliser le potentiel membranaire mitochondrial en régulant le flux de protons et leur localisation constitutive favoriserait cette fonction (Vander Heiden et Thompson, 1999).

1.4 Les caspases : exécutrices centrales de l'apoptose

Le coeur du processus de l'apoptose est constitué d'un système protéolytique composé d'une famille de protéases nommées caspases. Les caspases sont les principales responsables des changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose (Hengartner, 2000). 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 (cystéine **aspartases** « cysteinyl **aspartate-specific proteases** ») (Alnemri *et al.*, 1996). 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 15 caspases a été identifiée chez les mammifères. Parmi ceux-ci les caspases-1 à -10 et la caspase-14 ont été identifiés chez l'humain (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999; Chowdhury, Tharakan et Bhat, 2008). Les caspase-11 et -12 chez la souris sont les homologues des caspases-4 et -5 chez l'humain tandis que la caspase-13 exprimée chez le bovin est l'homologue de la caspase-4 chez l'humain (Denault et Salvesen, 2002; Koenig, Eckhart et Tschachler, 2001). La caspase-15 est une nouvelle caspase récemment découverte qui est exprimée chez les mammifères, mais qui n'est pas exprimée chez l'humain ni chez la souris. Cette caspase aurait un rôle à jouer dans l'apoptose, mais sa fonction spécifique reste à être étudiée (Eckhart *et al.*, 2006). Le rôle principal des caspases -1, -4, -5, -11 et -12 est dans la régulation de l'inflammation en clivant des formes immatures des cytokines dont la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 (Denault et Salvesen, 2002). La caspase-14 n'a pas de rôle dans l'apoptose, mais plutôt dans la différenciation terminale de l'épiderme (Mikolajczyk *et al.*, 2004). 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 (Kumar, 2007).

1.4.1 Structure des différentes caspases

Les caspases partagent des similarités au niveau de leur séquence en acides aminés et de leur structure. Les pro-caspases sont constituées de deux domaines : un pro-domaine N-terminal suivi d'un domaine protéase. Le domaine protéase est composé de deux sous-unités : une large (p20, ~20 kDa) et une petite (p10, ~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 initiatrices (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 (Kumar, 2007). Par exemple, les pro-domaines des caspases effectrices 6 et 7 contiennent 23 acides aminés tandis que le pro-domaine de la caspase initiatrice 10 en contient 219 (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999). Le domaine long des pro-caspases initiatrices 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 DED et interagissent comme discuté précédemment avec les protéines adaptatrices de la famille du TNFR dont FADD et TRADD. De plus, le domaine CARD se retrouve chez les pro-caspases -1, -2, -4 et -9 et est nécessaire à l'interaction entre les caspases et les 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 (Fesik, 2000).

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 qui comporte deux sites catalytiques (Figure 6) (Degterev, Boyce et Yuan, 2003; Fuentes-Prior et Salvesen, 2004).

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 en les clivant. 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 (Chowdhury, Tharakan et Bhat, 2008). 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 caspases -3 et -7 peuvent également être activées *in vitro* par les caspases -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 situé dans la sous-unité p20 au sein d'un motif très conservé QACXG, où le résidu X est R, Q ou G. En plus de cliver leurs substrats après un résidu d'acide aspartique, les caspases reconnaissent une séquence consensus de quatre acides aminés situés en amont du site de clivage. 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

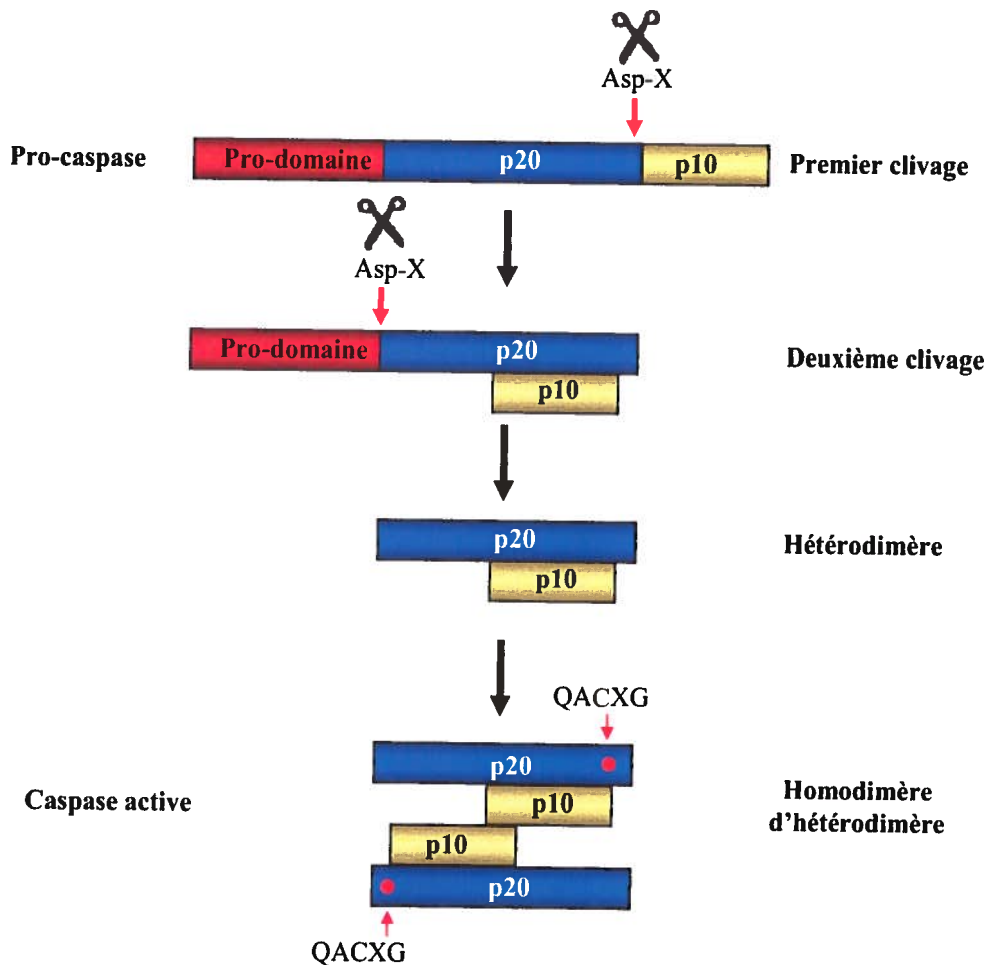


Figure 6 : Mécanisme d'activation des caspases. Les caspases sont activées suite à leur clivage. Les pro-caspases sont clivées en premier lieu entre les sous-unités p20 et p10, puis entre le pro-domaine et la sous-unité p20. L'enzyme mature est un hétérodimère qui s'associe avec un autre hétérodimère par l'interaction de la sous-unité p10 et forme un homodimère d'hétérodimère ou hétérotétramère. Le site catalytique actif des caspases est situé dans la sous-unité p20 au sein d'un motif très conservé QACXG, où le résidu X est R, Q ou G. (Adapté de Chowdhury, Tharakan et Bhat, 2008).

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 conduiront 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 II résume les principaux substrats clivés par les caspases. Jusqu'à présent, plus de 100 substrats ont été identifiés. Cependant, en analysant la séquence commune de reconnaissance des substrats, plusieurs centaines de protéines pourraient être des substrats des caspases (Chowdhury, Tharakan et Bhat, 2008). Les caspases clivent certains substrats directement impliqués dans le processus de l'apoptose dont certains membres de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bid et Bax) ainsi que le DFF45 (Kumar, 2007). Plusieurs substrats sont des composants impliqués dans la structure du cytosquelette et du noyau, dont l'actine, la gelsoline 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 (Poly (ADP-ribose) polymérase), DNA-PK et la protéine RF-C 140. 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 (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999; Chang et Yang, 2000). De nombreuses protéines impliquées dans les signalisations intracellulaires sont également des cibles des caspases. Par exemple, la protéine kinase Akt/PKB est clivée lors de l'apoptose inhibant son rôle dans la survie de la cellule (Rokudai *et al.*, 2000).

1.4.4 Régulation de l'activité et du processus des caspases

Étant donné les effets dévastateurs de l'activité de la plupart des caspases, la production, le processus et l'activité des caspases sont régulés par différents mécanismes afin d'éviter leur activation accidentelle. La phosphorylation des caspases inhibe leur activité en

Tableau II : Principaux substrats des caspases. (Tiré de Chang et Yang, 2000)

Substrats	
<p>Protéines apoptotiques</p> <p>Bax Bcl-2 Bcl-x_L Bid CrmA FLIP IAP Pro-caspases</p> <p>Régulation du cycle cellulaire</p> <p>Cdc27 Cycline A MDM2 p21 (Cip1/Waf1) p27 (Kip1) PITSLRE kinases Protéine du Rétinoblastome Wee1 phosphatase</p> <p>Métabolisme de l'ADN</p> <p>Acinus Complexe C répliquant l'ADN (DSEB/RFC140) Facteur de réplication de l'ADN MCM3 ICAD/DFF45 NuMA PARP Protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) Topoisomérase I</p> <p>Métabolisme de l'ARN</p> <p>Facteur d'initiation 2α des eucaryotes Protéine 70kDa de U1-snRNP Protéine ribonucléaire hétéronucléaire C1 et C2</p> <p>Facteurs de transcription</p> <p>Facteur de choc thermique GATA-1 IκB-α NF-κB (p50, p65) NRF-2 Sp1 STAT1</p>	<p>Protéines structurales</p> <p>Actine β-Caténine Cytokératine-18 et -19 Fodrine Gas2 Gelsoline Lamines Plakoglobine</p> <p>Transduction de signaux</p> <p>Akt/PkB Calmoduline-dépendante kinase IV Chaîne TCR-ζ c-Raf D4-GDP Fyn tyrosine kinase Kinase d'adhésion focale (FAK) 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 polypose adénomateuse colique (APC) Ras-GAP</p> <p>Précurseurs des cytokines</p> <p>Pro-IL-1β Pro-IL-16 Pro-IL-18 (IGIF)</p> <p>Protéines des maladies neurodégénératives</p> <p>APP Ataxine-3 (Ataxie spinocérébelleuse de type 3) Huntington Présénilines Récepteur androgénique (Protéine dentatorubrale-pallidolusiane)</p>

inhibant leur assemblage tétramérique. La phosphorylation de la caspase-9 par la protéine sérine/thréonine kinase Akt inhibe son activité *in vitro* et son activation *in vivo* (Cardone *et al.*, 1998). La caspase-9 peut également être phosphorylée par Erk («Extracellular signal-regulated kinase») (Allan *et al.*, 2003), PKC ζ (Brady, Allan et Clarke, 2005), CDK1/cyclin B1 (Allan et Clarke, 2007) et par la caséine kinase 2 (CK2) (McDonnell *et al.*, 2008). La p38 MAPK peut phosphoryler les caspases -8 et -3 (Alvarado-Kristensson *et al.*, 2004). La caspase-8 peut également être phosphorylée par la PKB (Shim *et al.*, 2004) et Lyn, un membre de la famille Src, et son activité peut être augmentée par sa déphosphorylation par la phosphatase SHP-1 (Jia *et al.*, 2008). À l'opposé des autres études, il a été rapporté que la phosphorylation de la caspase-3 par la PKC δ augmente l'activité de la caspase au lieu de la diminuer, ce qui suggère une étroite régulation des caspases par la phosphorylation (Voss *et al.*, 2005). Les membres de la famille Bcl-2 régulent également l'activité de certaines caspases, principalement la caspase-9. Bcl-2 et Bcl-xL, 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'apoptose pour prolonger la vie de leur hôte et maximiser leur réplication virale (Chang et Yang, 2000). La protéine virale cowpox CrmA joue 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 son site actif (Ray *et al.*, 1992). Une autre protéine produite par certains virus appelée ν -FLIP (FLICE-like inhibitory protein), 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 ν -FLIP 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 ν -FLIP pour le recrutement au niveau du complexe des récepteurs (Irmeler *et al.*, 1997). Deux homologues de FLIP ont été identifiés chez l'humain, la forme courte c-FLIP(S) et la forme longue c-FLIP(L). Puisqu'un rôle anti- et pro-apoptotique leurs ont été attribués, leurs fonctions précises reste à être déterminées (Scaffidi *et al.*, 1999a; Chang *et al.*, 2002). Originellement identifiée à partir du

baculovirus, la famille des IAPs joue un rôle important dans l'inhibition de l'apoptose par l'inhibition des caspases. Chez les mammifères, neuf homologues sont connus : XIAP, NAIP, cIAP1/HiAP2, cIAP2/HiAP1, hILP, survivine, ML-IAP, ILP2 et Bruce/Apollon (Chen *et al.*, 1999; Kumar, 2007). L'effet protecteur des IAPs est dû à leur capacité 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 (Eckelman, Salvesen et Scott, 2006). Les IAPs, 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 (Gène nouveau très intéressant « Really interesting new gene ») dans leur région C-terminale. Le domaine BIR2 semble être le principal domaine impliqué dans l'inhibition des caspases, mais le domaine BIR3 a également une implication puisqu'il peut inhiber la caspase-9 (Takahashi *et al.*, 1998). Les membres 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 IAPs 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 également comme des inducteurs de l'activation de NF- κ B pouvant contribuer à l'effet protecteur (Wang *et al.*, 1998).

1.5 Apoptose nucléaire

Le changement dans la balance intracellulaire des ions, le transport nucléo-cytoplasmique actif, l'activation protéolytique suivie du clivage de différentes protéines spécifiques, la condensation de la chromatine, l'activation d'endonucléases, le clivage de l'ADN et la formation de corps apoptotiques représentent les événements caractérisant l'apoptose nucléaire (Robertson, Orrenius et Zhivotovsky, 2000). La dégradation de l'ADN, lors de l'apoptose, est une particularité bien associée à ce type de mort cellulaire et c'est la modification morphologique la plus couramment détectée pour évaluer la mort cellulaire par apoptose. Elle consiste en une condensation périnucléaire de la chromatine menant à une destruction nucléaire massive (Widlak et Garrard, 2001). Un défaut dans l'induction de l'apoptose nucléaire a été démontré dans plusieurs types cellulaires mettant en cause des modifications de la phase effectrice de l'apoptose. L'absence de l'expression de

molécules effectrices comme la caspase-3 et le DFF a été rapportée dans différentes cellules cancéreuses (Janicke *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 2004). Il a aussi été rapporté que la perturbation de l'apoptose nucléaire peut être causée par un défaut du niveau d'expression de molécules effectrices comme le DFF40, le DFF45 et le cytochrome c (Luciano *et al.*, 2002). Toutefois, certaines lignées cellulaires détiennent une absence de fragmentation de l'ADN bien que le mécanisme apoptotique semble normal. Le défaut relié à l'absence d'apoptose nucléaire chez ces cellules est plutôt associé à une perturbation de cofacteurs impliqués dans la régulation de l'activité des molécules effectrices comme l'ATP et les ions (Rasola *et al.*, 1999; Iguci, Hirano et Ishida, 2002; Zhang *et al.*, 2001). L'apoptose nucléaire n'est pas un événement obligatoire pour le processus de mort cellulaire par apoptose. 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 ou des oncogènes (de la Taille *et al.*, 1999; Widlak, 2000). Cette fragmentation de l'ADN peut également éviter l'induction d'auto-anticorps contre la chromatine impliquée dans les maladies auto-immunes (Nagata, 2000). La dégradation de l'ADN est aussi un mécanisme qui facilite l'élimination de la cellule apoptotique par les phagocytes (Parrish et Xue, 2006), diminuant encore plus les chances de transfert d'informations génétiques à une cellule voisine ou l'induction d'auto-anticorps.

L'ADN peut subir deux types de fragmentation lors de l'apoptose. Premièrement, un clivage de l'ADN précoce effectué, entre autres, par la topoisomérase II α , la DNAS1L3, l'AIF et le DFF40 qui créent des fragments de haut poids moléculaire de 50 à 300 kpb détectables par gel d'électrophorèse en champ pulsé (Walker *et al.*, 1999; Widlak et Garrard, 2009). Le taux de génération de ce type de fragments dépend du type de cellules ainsi que du stimulus apoptotique. Le second type de fragmentation est la fragmentation internucléosomale où les fragments de haut poids moléculaire subissent un second clivage générant des fragments de petit poids moléculaire de 180 à 200 pb. Ce dernier type de fragmentation est effectué, entre autres par, les nucléases DNase I, DNase γ , DNAS1L3, NUC18, endonucléase G et DFF40. 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 Ca^{2+} et du Mg^{2+} . 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 Ca^{2+} et de Mg^{2+} , de Ca^{2+} et de Mn^{2+} ou de Mn^{2+} seul, ainsi que les nucléases NUC18 et NUC70. Le deuxième groupe représente les endonucléases dépendantes du Mg^{2+} 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; Lecoecur, 2002).

1.5.1 Le DFF40 : facteur de fragmentation de l'ADN

Parmi les nucléases impliquées dans l'apoptose, le DFF40 est l'endonucléase principalement responsable de la fragmentation de l'ADN au cours de l'apoptose. En effet, 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, le DFF45 (Widlak, 2000). Le complexe DFF45/DFF40 retrouvé chez l'humain est l'équivalent du complexe ICAD-L/CAD (ICAD-L pour « Inhibitor of caspase activated DNase-long splice form » et CAD pour « Caspase activated DNase ») retrouvé chez la souris et comporte 75 % de similitudes structurales. L'association DFF45/DFF40 forme le complexe DFF où le DFF45 est la sous-unité régulatrice tandis que le DFF40 est la sous-unité catalytique (Widlak, 2000). Deux isoformes du DFF45 existent par épissage alternatif, le DFF45 et le DFF35 un isoforme court de 35 kDa, DFF35 (« DNA fragmentation factor 35 ») ou ICAD-S « Inhibitor of caspase activated DNase-short splice form ») (Masuoka *et al.*, 2001). Le DFF40 est composé de 345 acides aminés, le DFF45 est composé de 331 acides aminés, tandis que le DFF35 est composé seulement de 268 acides aminés (Gu *et al.*, 1999; Widlak, 2000). La région C-terminale du DFF40 renferme un domaine catalytique. En effet, la délétion des acides aminés 290 à 345 inhibe

l'activité enzymatique de cette nucléase (Inohara *et al.*, 1999). Le DFF40 et le DFF45 possèdent peu d'homologies structurales, mais ils possèdent chacun un domaine conservé de 80 acides aminés dans leur région N-terminal (Widlak, 2000). Ce domaine, nommé CIDE-N, joue un rôle dans les interactions entre le DFF40 et le DFF45 (Zhou *et al.*, 2001). Le complexe DFF45/DFF40 est également 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). La région C-terminale du DFF40 et du DFF45 renferme une séquence de localisation nucléaire (NLS pour « Nuclear localization signal »).

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. 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 impliqués dans cette fonction. 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). Le DFF45 et le DFF35 peuvent également inhiber le DFF40 sous sa forme active protégeant la cellule contre une activation accidentelle du DFF40 (Widlak *et al.*, 2003). Le DFF45 est clivé aux acides aminés 117 et 224, formant trois fragments de 10 à 15 kDa suite à l'activation de la caspase-3 (McCarty, Toh et Li, 1999). Le DFF45 peut également être clivé par la caspase-7, la granzyme B et M mais avec une plus faible affinité (Liu *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2000; Sharif-Askari *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2006b).

Il a été rapporté que, sous sa forme inactive, le DFF40 forme un hétérodimère avec le DFF45 d'environ 100 kDa (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998; Halenbeck *et al.*, 1998; Woo *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 1999; Widlak *et al.*, 2003). Par contre, une autre étude a

décrit le complexe comme étant également un hétérotétramère ou un dimère d'hétérodimères d'environ 180 kDa (Lechardeur *et al.*, 2005). Il a été suggéré que le complexe DFF sous la forme d'hétérotétramère faciliterait la formation d'homo-oligomères du DFF40 après le clivage du DFF45 (Widlak et Garrard, 2009). En effet, lors de la libération du DFF40 il y a formation d'homo-oligomères nécessaires pour l'activation de la nucléase et qui représente sa forme active (Widlak *et al.*, 2003). La taille de ces homo-oligomères demeure controversée. Il a été rapporté que ces structures seraient de larges homo-oligomères où la forme tétramère serait la forme la plus petite (Halenbeck *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999; Widlak *et al.*, 2003), tandis qu'une autre équipe a défini que la taille maximale de ce complexe serait sous la forme tétramère (Lechardeur *et al.*, 2005). Widlak et Garrard (2009) ont suggéré que la formation d'homo-oligomères du DFF40 excessivement larges pourrait diminuer l'activité du DFF40 et se produirait à un niveau très avancé dans le processus de l'apoptose.

1.5.1.1 Molécules effectrices régulant le DFF40

Outre le DFF45 et le DFF35 connus comme molécules inhibitrices du DFF40, d'autres molécules ayant une implication dans la régulation de cette nucléase ont été identifiées (Figure 7). Les chaperonnes Hsc70 et Hsp40 assistent à l'assemblage fonctionnel du complexe DFF pendant sa traduction (Sakahira et Nagata, 2002). De plus, la molécule HSP70 peut se lier au DFF40 activé ce qui stimule et stabilise son activité (Liu *et al.*, 2003). L'activité nucléase du DFF40 est stimulée par des protéines chromosomales spécifiques dont l'histone H1, HMGB-1/-2 et la topoisomérase II (Liu *et al.*, 1998; Widlak *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1999). Ces protéines chromosomales contribuent à la spécificité du clivage de l'ADN par le DFF40. En effet, l'histone H1 et HMGB1 sont des protéines qui lient les régions internucléosomales de l'ADN contribuant à la fragmentation de l'ADN dans ces régions par le DFF40. La topoisomérase II, quant à elle, est responsable du clivage initial de l'ADN en haut poids moléculaire (50-300 kpb) au niveau des domaines en boucle de la chromatine (Widlak et Garrard, 2009). Récemment, la phosphorylation de l'histone H2A.X a été démontré comme étant nécessaire pour la fragmentation de l'ADN par le DFF40 lors de l'apoptose induite par

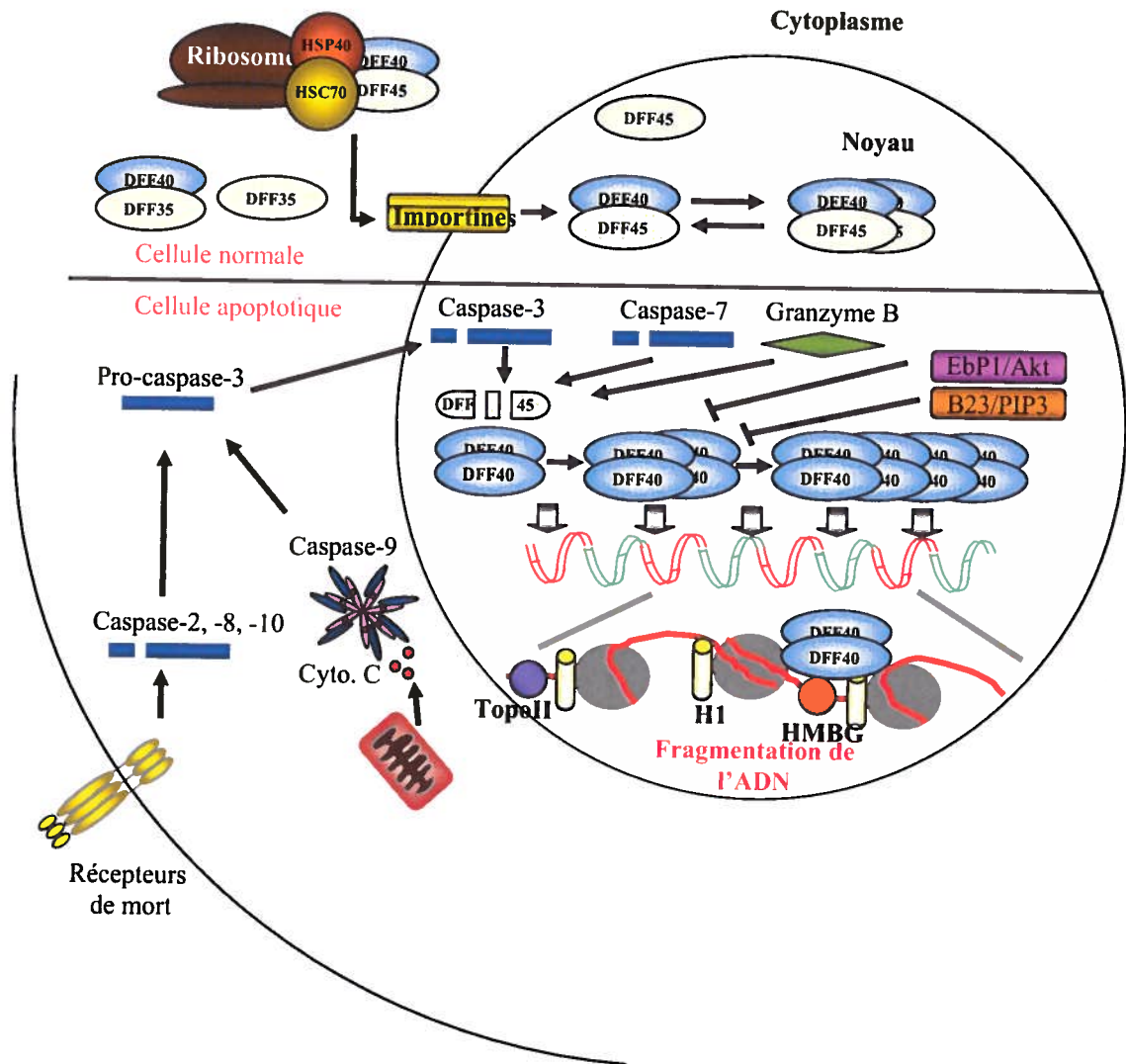


Figure 7 : Mécanisme de régulation du DFF40. Régulation du complexe DFF chez les cellules normales et après induction de l'apoptose. Sous sa forme inactive, le DFF40 est associé à la sous-unité régulatrice DFF45/DFF35. Les molécules chaperonnes Hsc70 et Hsp40 assistent à l'assemblage fonctionnel du complexe DFF pendant sa traduction. Suite à l'activation de l'apoptose, le DFF45 est clivé par la caspase-3, la caspase-7 ou la granzyme B. Lors de la libération du DFF40, il y a formation d'homo-oligomères nécessaire pour l'activation de la nucléase et qui représente sa forme active. Les complexes B23/PI3P et EbP1/Akt inhibent la nucléase par leur liaison avec le DFF40 actif. L'activité nucléase du DFF40 est stimulée par des protéines chromosomales spécifiques dont l'histone H1, HMGB-1/-2 et la topoisomérase II. (Adapté de Widlak et Garrard, 2009)

l'irradiation aux rayons ultraviolets (UV) (Lu *et al.*, 2006a). La nécessité de la phosphorylation de l'histone H2A.X est un mécanisme de régulation de la fragmentation de l'ADN qui reste à être élucidé pour comprendre à quel niveau précis cet événement agit. Les complexes nucléophosmine (B23)/PI3P (Phosphatidylinositol-3 phosphate) et Ebp1 (« ErbB3 binding protein 1 »)/Akt inhibent la nucléase par leur liaison avec le DFF40 actif (Ahn *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2006). La protéine CIIA inhibe la nucléase en se liant directement au complexe DFF (Cho *et al.*, 2003). L'activité nucléase du DFF40 peut aussi être inhibée par les poly-anions, comme l'héparine, l'acide polyglutamique, le poly(ADP-ribose) et les acides nucléiques (ADN simple brin, ARN et ADN-ARN hétéroduplexes) (Hanus, Kalinowska-Herok et Widlak, 2008; Widalk et Garrard, 2006; West, Ji et Marnett, 2005). Ces poly-anions sont des inhibiteurs compétitifs du DFF40 et se lieraient à la surface du DFF40 chargée positivement (Widalk et Garrard, 2006; Reh *et al.*, 2005). L'activité du DFF40 peut aussi être affectée par la concentration ionique de la cellule. En effet, l'activité endonucléase du DFF40 requière des co-facteurs dont du Mg^{2+} , un efflux d'ions de chlore, une élévation intracellulaire de Ca^{2+} et un pH neutre. De plus, son activité est optimale à une concentration intracellulaire de K^+ allant de 50 à 125 mM, une concentration représentative de cellules apoptotiques (Widlak et Garrard, 2001). Bien que les études publiées au cours des dernières années ont contribué à l'augmentation des connaissances sur la régulation du DFF40, son mécanisme de régulation demeure à être étudié davantage pour compléter l'état de nos connaissances.

1.6 L'importance du transport nucléaire dans l'apoptose

Le transport nucléaire est un processus important dans la régulation d'une variété de systèmes de signalisation. En effet, le transport nucléaire contrôle plusieurs processus biologiques comme la division cellulaire, la réponse à des cytokines ainsi que la mort cellulaire par apoptose. La destruction du noyau lors de l'apoptose est exécutée par plusieurs molécules pro-apoptotiques qui sont souvent activées dans le cytoplasme et sont par la suite transloquées au niveau du noyau. Ces mouvements nucléocytoplasmiques de molécules de signalisation représentent donc un processus important dans l'exécution de la mort cellulaire par apoptose.

1.6.1 Le transport nucléaire

Le cytoplasme et le nucléoplasme sont séparés par l'enveloppe nucléaire, un système membranaire qui détient une perméabilité hautement sélective. Le transport bidirectionnel de macromolécules entre le noyau et le cytoplasme est régulé par le complexe du pore nucléaire (CPN) retrouvé dans la double membrane de l'enveloppe nucléaire. Le CPN est un des plus gros assemblage moléculaire de la cellule. Une structure très élaborée, composée de plus de 30 molécules où la plupart se nomment, nucléoporine (NUP). La masse moléculaire du CPN est estimée à environ 60 méga Dalton (Cronshaw *et al.*, 2002). La composition du CPN comprend trois sous-structures : un canal central entouré de deux anneaux, c'est-à-dire des fibrilles cytoplasmiques et un panier nucléaire (Figure 8) (Fried et Kutay, 2003; Ferrando-May, 2005).

Le transport à travers les CPNs peut se faire par diffusion passive selon le gradient de concentration à travers l'enveloppe nucléaire ou par un transport actif dépendant d'un signal et de l'énergie. Le transport passif peut laisser passer des molécules allant jusqu'à environ 40 kDa, tandis que le transport actif peut laisser passer des molécules jusqu'à plusieurs millions de dalton. Ce type de transport implique des protéines appelées importines et exportines. Le transport actif se déroule en 5 étapes (Figure 9) (Ferrando-May, 2005) :

- 1- Reconnaissance du signal de localisation nucléaire, la SLN ou d'exportation (SEN, pour séquence d'exportation nucléaire) sur la molécule à transporter par une protéine d'importation (Importine) ou d'exportation (Exportine).
- 2- Arriver de la molécule avec le récepteur au CPN.
- 3- Translocation à travers le CPN.
- 4- Libération de la protéine transportée.
- 5- Recyclage du récepteur.

La direction du transport à travers l'enveloppe nucléaire est déterminée par une protéine nucléaire, la GTPase Ran, et par des facteurs de régulation comme RCC1, un facteur

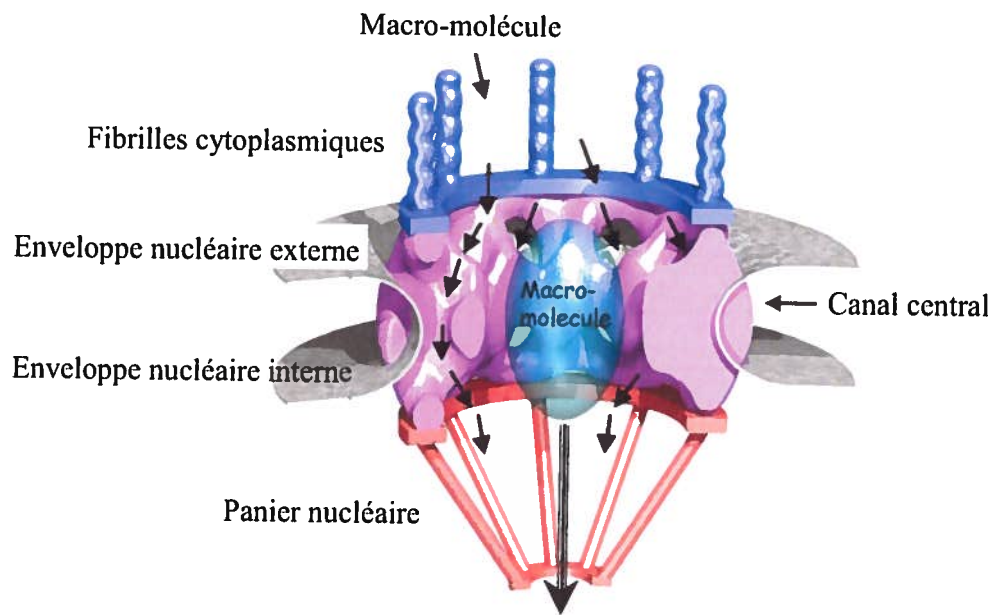


Figure 8 : Structure du complexe du pore nucléaire. Représentation de la structure tridimensionnelle du complexe du pore nucléaire. La composition du CPN comprend trois sous-structures : un canal central (rose) entouré de deux anneaux, c'est-à-dire les fibrilles cytoplasmiques (mauve) et le panier nucléaire (rouge) (Tiré de Hinshaw, Carragher et Milligan, 1992)

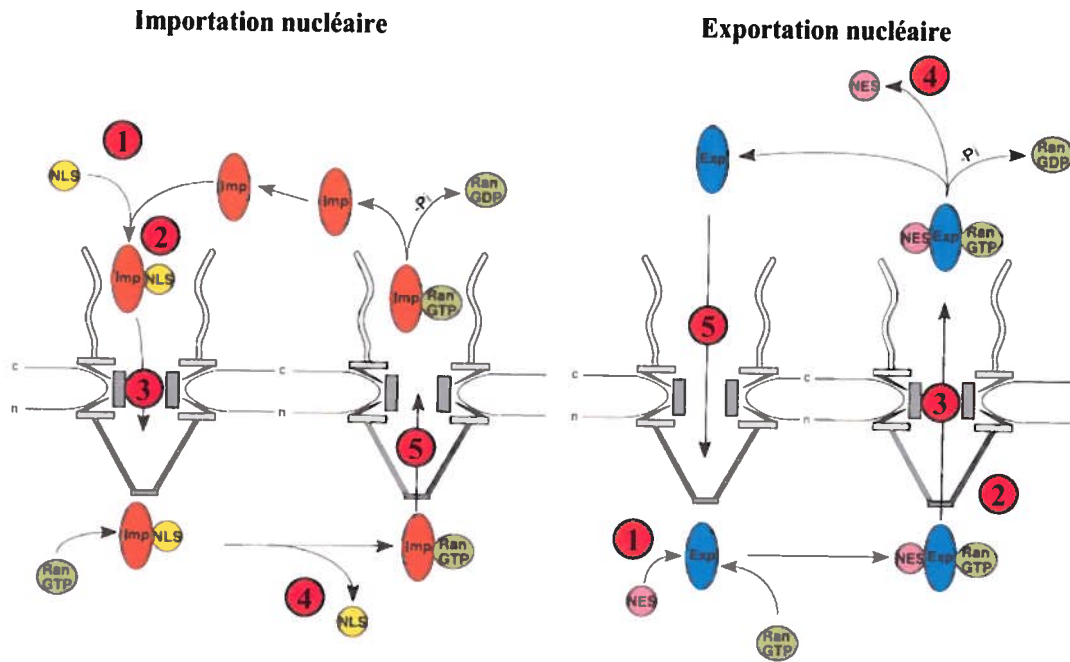


Figure 9 : Étapes du transport nucléaire. 1-Reconnaissance d'une SLN ou d'une SEN sur la molécule à transporter par un récepteur d'importation ou d'exportation. 2- Arriver de la molécule avec le récepteur au CPN. 3- Translocation à travers le CPN. 4- Libération de la protéine transportée. 5- Recyclage du récepteur. (Modifié de Fahrenkrog, 2006)

d'échange de GTP et la protéine RanGAP, une protéine activant les GTPases. RCC1 est une protéine liée à la chromatine et localisée seulement au niveau nucléaire qui maintient les niveaux de RanGTP élevés au niveau nucléaire. La protéine RanGAP se situe plutôt au niveau des fibrilles cytoplasmiques et garde les concentrations cytoplasmiques RanGTP très bas par la catalysation de l'hydrolyse de GTP par Ran. RanGTP affecte l'affinité des récepteurs importines et exportines aux molécules à transporter. En effet, RanGTP promouvoit la formation des complexes d'exportation et induit la dissociation des complexes d'importation (Adam, 2001; Ferrando-May, 2005). Donc, les récepteurs exportines peuvent lier seulement les protéines contenant une SEN dans le noyau à des niveaux élevés de RanGTP contrairement aux récepteurs importines qui vont lier des protéines contenant une SLN seulement au niveau du cytoplasme (Ferrando-May, 2005).

Plusieurs mécanismes de régulation influencent le transport nucléocytoplasmique des protéines dont la dissimulation des signaux de transport sur les molécules à transporter par une oligomérisation ou par des modifications post-traductionnelles, la rétention de molécules dans un compartiment par sa liaison avec une autre molécule et la modulation de l'activité des récepteurs de transport et l'altération du CPN (Ferrando-May, 2005).

1.6.2 Altérations du transport nucléaire lors de l'apoptose

Le transport nucléaire joue un rôle important dans la translocation des signaux d'apoptose où il déclenche des modifications biochimiques et morphologiques observées durant cette mort cellulaire. L'accessibilité des régulateurs clés de l'apoptose semble être fortement modulée par le transport nucléaire. L'inhibition de l'import nucléaire peut même être un facteur déclenchant l'apoptose (Fahrenkrog, 2006).

Toutefois, lors de l'apoptose le système de transport nucléaire et ses composants sont altérés. Les mécanismes de régulation du transport nucléaire durant l'apoptose sont encore peu connus. Par contre, quelques études ont permis d'améliorer nos connaissances à ce sujet. Un indicateur précoce de l'activation de l'apoptose est la redistribution

cellulaire de Ran et de facteurs impliqués dans le transport nucléaire comme les importines (Fahrenkrog, 2006). Il est à noter que cet événement se produit avant l'activation des caspases. Au cours de cette redistribution, la perméabilité limite d'exclusion des CPNs augmente, laissant passer une molécule dextran de 70 kDa (Ferrando-May *et al.*, 2001). Par la suite, les caspases altèrent le transport nucléaire actif en attaquant les composants du CPN. À ce jour, le démantèlement du CPN n'est pas bien élucidé. Néanmoins, certaines nucléoporines sont connues pour être clivées par les caspases dont RanBP2, NUP214 dans les fibrilles cytoplasmiques, NUP96, NUP93, POM121 dans le canal central et NUP153, Tpr, NUP50 dans le panier nucléaire (Kihlmark *et al.*, 2004; Ferrando-May, 2005). La dégradation des pores nucléaires semble être selon un ordre séquentiel et requière l'activation de la caspase-3 et/ou de la caspase-6 (Buendia, Santa-Maria et Courvalin, 1999; Ferrando-May *et al.*, 2001; Kihlmark *et al.*, 2004). POM121 et RanBP2 semblent être des cibles précoces et leur dégradation précède la dégradation de l'ADN. Tandis que la dégradation de NUP153 coïncide avec le début de la fragmentation de l'ADN (Kihlmark, Imreh et Hallberg, 2001; Kihlmark *et al.*, 2004). La caspase-9 jouerait un rôle important dans le démantèlement des pores nucléaires. Cette caspase initiatrice inactiverait le transport nucléaire et augmenterait la limite de diffusion des pores nucléaires. Cette augmentation de la perméabilité permettrait à la caspase-3 et à d'autres molécules impliquées dans l'apoptose (qui ne pouvaient pas passer par les pores nucléaires dans les cellules en prolifération) d'entrer dans le noyau par diffusion (Faleiro et Labzebnik, 2000; Kihlmark *et al.*, 2004).

1.6.3 Le complexe DFF et le transport nucléaire

Le complexe DFF est localisé au niveau du noyau (Liu *et al.*, 1998; Samejima et Earnshaw, 1998; Samejima et Earnshaw, 2000; Lechardeur *et al.*, 2000), malgré le fait qu'il a premièrement été isolé à partir d'extraits cytoplasmiques (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998). L'isolation du DFF, à partir d'extraits cytoplasmiques provient de la méthode de séparation des différentes fractions cellulaires où des protéines nucléaires peuvent se retrouver facilement dans la fraction cytoplasmique (Widlak *et al.*, 2003). La NLS retrouvée chez le DFF40 et celle du DFF45 créent ensemble une synergie nécessaire pour

la localisation du complexe DFF au noyau. Le complexe DFF se déplace entre le cytoplasme et le noyau, mais il revient constamment dans le noyau par le transport nucléaire. L'importation du complexe au niveau du noyau se fait par sa liaison à l'hétérodimère importine α/β (Neimanis *et al.*, 2007). Le DFF35 ne possède pas de NLS et sa fonction d'inhibition se produit principalement au niveau du cytoplasme (Scholz *et al.*, 2002).

1.7 Importance des molécules de stress dans l'apoptose

1.7.1 Les MAP kinases p38, Erk et JNK

Les p38, Erk et JNK MAPKs ont couramment été rapportées comme ayant un rôle dans le mécanisme d'induction de l'apoptose. Toutefois, le rôle des MAPKs dans l'apoptose est très contradictoire et leur implication diffère selon le type cellulaire, le contexte ainsi que le stimulus d'induction de l'apoptose. Conséquemment, certaines études démontrent que ces kinases détiennent un rôle anti-apoptotique, tandis que d'autres démontrent qu'elles ont plutôt un rôle dans l'induction de l'apoptose. Bien que Erk soit davantage reconnu pour son rôle de protection contre l'induction de l'apoptose, plusieurs études lui ont rapporté un rôle pro-apoptotique. Par exemple, chez des cellules T Jurkat, l'apoptose induite par la galectine-8 crée une forte activation de Erk-1/-2 et l'induction de l'apoptose est dépendante de Erk-1/-2 (Norambuena *et al.*, 2009). Les protéines p38 et JNK sont des kinases activées par le stress (SAPK pour « stress-activated protein kinase ») qui sont souvent activées par des stimuli apoptotiques. Ces kinases régulent le complexe transcriptionnel AP-1 associé à la survie cellulaire. Toutefois, AP-1 peut également activer des gènes pro-apoptotiques comme FasL, Bim et TNF (Vasilevskaya et O'Dwyer, 2003). Un exemple de l'implication de p38 et de JNK est lors de l'induction de l'apoptose par l'agent antifongique pramanicine, chez les cellules T Jurkat. L'induction de cette apoptose est dépendante de l'activation de JNK et de p38 (Kutuk *et al.*, 2005). JNK peut également directement interagir avec des molécules pour induire l'apoptose dont Bcl-2, Bim, Bmf, BAD, p53 et p73 (Dhanasekaran et Reddy, 2008).

1.7.2 Le proto-oncogène Akt

À ce jour, trois membres de la famille des protéines sérine/thréonine kinases Akt, ont été identifiés : Akt1 (Akt), Akt2 et Akt3. Akt1 est exprimé à des niveaux élevés et de façon ubiquitaire sauf dans les reins, le foie et la rate. L'expression de Akt2 varie selon les tissus et est exprimé à des niveaux élevés dans les muscles, les organes intestinaux et le système reproducteur. Quant à Akt3, il est fortement exprimé dans le cerveau et les testicules, tandis qu'il est faiblement exprimé dans les organes intestinaux et les muscles (Franke *et al.*, 2003). Bien qu'ils sont le produit de différents gènes, ils possèdent 80% d'homologie entre eux (Martelli *et al.*, 2006). Étant donné que les différents isoformes de Akt sont activés de façon similaire et qu'ils ont la même spécificité et efficacité d'activation des substrats, il a été proposé que l'expression de ces différents isoformes aurait une fonctionnalité de redondance (Franke, 2000). Suite à une variété de stimuli dont, entre autres, des hormones, des facteurs de croissance et des cytokines, Akt qui est inactif et localisé dans le cytoplasme, est premièrement recruté à la membrane plasmique par les produits générés par PI3K, c'est-à-dire PIP2 et PIP3 (Franke *et al.*, 2003). Par la suite, Akt est phosphorylé sur la thréonine 308, ainsi que sur la sérine 473 et cette double phosphorylation active la kinase Akt. PDK1 est la kinase responsable pour la phosphorylation de Akt sur la thréonine 308 tandis que plusieurs candidats ont été proposés pour la phosphorylation sur la sérine 473 dont PDK2, ILK1, DNA-PK ainsi qu'un mécanisme d'autophosphorylation (Delcommenne *et al.*, 1998; Chan et Tschlis, 2001; Feng *et al.*, 2004; Brazil, Yang et Hemmings, 2004). Une fois activé, Akt est transloqué au niveau du cytoplasme puis au noyau et interagit avec ses substrats pour favoriser la survie cellulaire. La kinase Akt joue un rôle important dans la différenciation, la prolifération et dans la survie des cellules. Cette kinase est connue comme étant un proto-oncogène, impliquée dans la tumorigenèse et dans la résistance aux traitements de chimiothérapie (Fresno Vara *et al.*, 2004; Martelli *et al.*, 2005). En effet, l'activation de Akt joue un rôle important dans le maintien des cellules en vie par le blocage de la signalisation apoptotique. Il a été démontré que cette kinase agit comme étant une molécule anti-apoptotique dans plusieurs modèles d'induction de l'apoptose comme le stress oxydatif, l'absence de facteurs de signalisation extracellulaire, l'irradiation et un

choc ischémique (Franke *et al.*, 2003). Plusieurs substrats de Akt ont été identifiés et exercent un rôle dans la suppression de l'apoptose. Premièrement, Akt peut inhiber l'apoptose en phosphorylant BAD et BAX, deux membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, ce qui les inactive (Duronio, 2008). Akt peut également phosphoryler les facteurs de transcription Forkhead, ce qui les séquestre dans le cytoplasme et provoque leur dégradation. Lorsque ces facteurs de transcription sont actifs, ils induisent la transcription de molécules pro-apoptotiques dont PUMA, Bim et FasL (Arden et Biggs, 2002; Duronio, 2008). Akt inactive également la p53 en phosphorylant sa molécule inhibitrice MDM2 (Mayo et Donner, 2001). La pro-caspase-9 initiateur peut aussi être phosphorylée par Akt ce qui inhibe son activation (Cardone *et al.*, 1998). Akt phosphoryle également la protéine GSK3 ce qui inhibe l'induction de l'apoptose, mais les mécanismes de régulation de GSK3 reste à être davantage précisés (Duronio, 2008). Il a été démontré que Akt peut également inhiber la fragmentation de l'ADN en inhibant l'activité du DFF40 lorsque Akt est localisé au niveau nucléaire et associé avec la molécule Ebp1 (Ahn *et al.*, 2006). Il ne serait pas surprenant de découvrir plusieurs autres substrats de Akt impliqués dans l'inhibition de l'apoptose.

1.7.3 La protéine kinase C δ

La famille des protéines kinases C (PKC), des protéines sérine/thréonine kinases, régule plusieurs fonctions cellulaires dont la prolifération et la survie. Cette famille comporte 12 membres dont PKC α , β , ϵ , ζ qui peuvent supprimer l'apoptose et PKC δ qui agit plutôt comme un signal pro-apoptotique dans plusieurs types cellulaires (Brodie et Blumberg, 2003; Reyland, 2007). La PKC δ est le membre qui a été le plus étudié quant à son rôle dans l'apoptose. C'est une kinase exprimée de façon ubiquitaire impliquée également dans la prolifération cellulaire (Reyland, 2007). La PKC δ est activée suite à de nombreux stimuli apoptotiques dont lors de dommages à l'ADN, suite à un stress oxydatif ainsi que par la liaison des récepteurs de mort (Reyland *et al.*, 1999; Majumder *et al.*, 2001; Khwaja et Tatton, 1999). Son implication dans l'apoptose a été démontrée avec l'expression d'un mutant de PKC δ , PKC δ KD (KD pour « kinase dead »), qui possède un domaine kinase inactif, inhibant l'apoptose induite par différents facteurs (Matassa *et al.*,

2001). L'expression de ce mutant inhibe des événements précoces de l'apoptose comme la perturbation du potentiel mitochondrial, mais également des événements tardifs comme l'activation des caspases ainsi que la fragmentation de l'ADN (Matassa *et al.*, 2001). Le processus d'activation de PKC δ a été évalué suite à l'induction de l'apoptose par des dommages à l'ADN (Reyland, 2007). Lors de l'activation de l'apoptose, PKC δ devient phosphorylée sur des résidus tyrosine puis elle est transloquée vers le noyau et clivée par la caspase-3, ce qui génère une kinase constitutivement active. Bien que quelques substrats de PKC δ ont été identifiés, les mécanismes moléculaires par lesquels PKC δ régule l'apoptose reste toujours inconnu. Ces substrats incluent la lamine B, une protéine kinase de l'ADN, la protéine hRad9, la p53, la p73 ϵ , STAT1 ainsi que l'activation indirecte de JNK (Cross *et al.*, 2000; Bharti *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 2003; DeVries *et al.*, 2004; Yoshida, Liu et Miki, 2006; Ren *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2002).

1.7.4 Le facteur de transcription NF- κ B

NF- κ B représente une famille de facteurs de transcription impliquée dans l'induction de plus d'une centaine de gènes. La famille de NF- κ B (ou Rel) est composée chez l'humain des protéines RelA(p65), RelB, c-Rel, p105(NF- κ B1) et p100(NF- κ B2). NF- κ B est grandement connu pour ses divers rôles joués dans le système immunitaire dont l'inflammation et la réponse de phase aiguë, mais également dans la croissance cellulaire, l'apoptose ainsi que l'oncogenèse. (Kucharczak *et al.*, 2003). NF- κ B a couramment été identifié comme un important régulateur de plusieurs gènes anti-apoptotiques et de survie. La fonction anti-apoptotique de NF- κ B est principalement attribuée à la régulation des gènes anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (Duronio, 2008). Plusieurs autres gènes anti-apoptotiques sont également induits par NF- κ B dont FLIP (inhibiteur de la caspase-8), les inhibiteurs de caspases membres de la famille IAP (c-IAP-1, c-IAP-2, XIAP), MnSOD qui élimine les espèces réactives oxygénées et GADD45 β qui inhibe certains récepteurs de mort. Une activation constitutive de NF- κ B a été retrouvée dans plusieurs types de cancer dont certains lymphomes ainsi que dans des tumeurs solides comme le cancer du sein et de la prostate (Kucharczak *et al.*, 2003). Bien que NF- κ B est grandement impliqué

dans la survie cellulaire, un rôle pro-apoptotique lui a également été attribué. Les gènes pro-apoptiques induits par NF- κ B sont principalement des récepteurs de mort cellulaire et leurs ligands, dont Fas et FasL, mais également les facteurs de transcription p53 et c-myc ainsi que Bcl-xS qui est un antagonisme de Bcl-2 (Karin et Lin, 2002; Burstein et Duckett, 2003). Le mécanisme d'activation de NF- κ B dans l'induction de l'apoptose reste à être précisé. Il a été proposé que le suppresseur de tumeur p53 pourrait avoir un rôle à jouer dans l'activation de NF- κ B suite à des dommages à l'ADN (Ryan *et al.*, 2000) L'activité transcriptionnelle anti- ou pro-apoptotique de NF- κ B serait dépendante du type cellulaire, du contexte ainsi que la molécule activant NF- κ B (Kucharczak *et al.*, 2003).

CHAPITRE 2

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

2.1 Introduction

Le CD45 est une importante tyrosine phosphatase retrouvée spécifiquement chez toutes les cellules hématopoïétiques nucléées et leurs précurseurs (Penninger *et al.*, 2001). Le CD45, originalement appelé l'*antigène commun des leucocytes (LCA* pour « leukocyte common antigen ») est la glycoprotéine de surface la plus abondante chez les cellules lymphoïdes représentant jusqu'à 10 % de toutes les molécules de surface (Trowbridge et Thomas, 1994). Cette molécule a été décrite comme la tyrosine phosphatase ayant un rôle majeur chez les lymphocytes où son activité phosphatase peut représenter jusqu'à 90 % de l'activité phosphatase totale de ces cellules (Isakov, 1993; Altin et Sloan, 1997). Le CD45 est connu comme étant un régulateur essentiel de voies de signalisation chez les cellules du système immunitaire (Hermiston, Xu et Weiss, 2003). Le rôle principal attribué à la molécule CD45 est de réguler l'amplitude de la signalisation intracellulaire induite par certains récepteurs cellulaires. Toutefois, un tout autre rôle commence à être décerné au CD45, celui de la régulation de la survie et de la mort cellulaire (McNeill *et al.*, 2004; Earl et Baum, 2008).

2.2 Structure et isoformes du CD45

Le CD45 est une protéine tyrosine phosphatase transmembranaire de type I constituée d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une région cytoplasmique. La région cytoplasmique, hautement conservée parmi les espèces, est composée de deux domaines protéine tyrosine phosphatase (PTPase), D1 et D2 ainsi que d'une queue en C-terminale (Hermiston, Xu et Weiss, 2003). Les domaines D1 et D2 sont composés de 240 acides aminés et séparés par une région de 56 acides aminés (Trowbridge et Thomas, 1994). Le domaine D1 est le seul domaine à détenir une activité

phosphatase. Par contre, les deux domaines sont requis pour l'activité enzymatique, le domaine D2 serait un régulateur de l'activité phosphatase du domaine D1 (Kashio *et al.*, 1998). Il a été proposé que le domaine D2 se lierait à la protéine du cytosquelette fodrine ce qui permettrait l'accès au domaine D1 par les différents substrats du CD45 (Lokeshwar et Bourguignon, 1992; Lida, Lokeshwar et Bourguignon, 1994). Le CD45 est exprimé sous plusieurs isoformes suite à l'épissage alternatif de trois exons codant pour la séquence près de la région extracellulaire N-terminale. Ces exons 4, 5 et 6 sont également désignés A, B, et C (Penninger *et al.*, 2001). Ainsi, il peut y avoir génération de huit isoformes dont cinq sont exprimés à des niveaux considérables chez les lymphocytes T. Des études sur l'ARN messager du CD45 ont démontré qu'il y aurait également épissage alternatif des exons 7, 8 et 10, mais l'expression d'isoformes spécifiques correspondant à ces épissages reste à être démontrée (Virts, Barritt et Raschke, 1998). Les trois exons 4, 5 et 6 renferment des sites de O-glycosylation. Le reste de 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). L'épissage alternatif modifie énormément la structure extracellulaire du CD45. En effet, le poids des isoformes varie considérablement de 180 à 240 kDa dépendamment des exons exprimés et du niveau de la glycosylation du domaine extracellulaire (Hermiston, Xu et Weiss, 2003). 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 10). Le tiers du poids moléculaire du CD45 mature est constitué d'hydrates de carbone variant quantitativement et qualitativement dépendamment de l'isoforme exprimée, du type cellulaire, de l'état d'activation et de l'état de différenciation de la cellule (Trowbridge et Thomas, 1994; Arendt et Ostergaard, 1997). Les cellules naïves expriment principalement l'isoforme CD45RA+. Trois à cinq jours suite à l'activation de la cellule naïve, l'isoforme CD45RA+ est remplacé par l'isoforme CD45RO. Les cellules T mémoires expriment principalement l'isoforme CD45RO (Xu et Weiss, 2002).

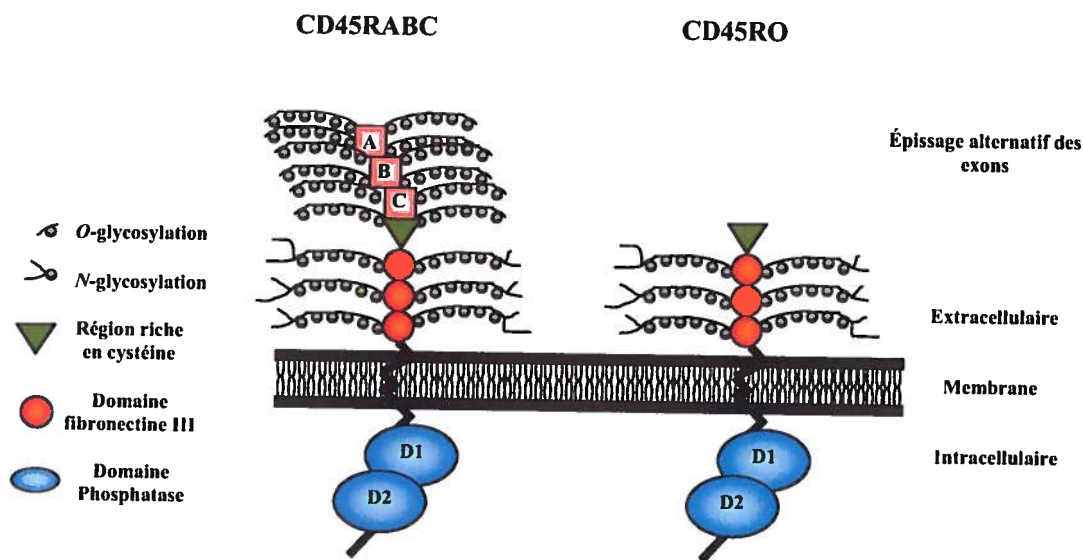


Figure 10 : Structure de l'isoforme CD45RABC et de l'isoforme CD45R0. Contrairement à l'isoforme CD45R0, l'isoforme CD45RABC détient les trois domaines épissés alternativement notés A, B et C. La région extracellulaire du CD45 est fortement glycosylée et détient également une région riche en cystéine. La région intracytoplasmique du CD45 contient deux domaines phosphatases, D1 et D2 où seulement le domaine D1 détient une activité enzymatique. (Adapté de Penninger *et al.*, 2001)

2.3 Cascades de signalisation via le TCR : transduction de signaux en aval du CD45

Les lymphocytes T jouent un rôle important dans la réponse immune 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 pour « T cell receptor ») lors de la reconnaissance de peptides étrangers liés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou de classe II retrouvé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). 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 (Geisler, 2004).

Le TCR est un hétérodimère polymorphe 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 les chaînes ζ , requises pour l'expression du récepteur de surface et la transduction de signaux (Kiefer, Vogel et Arnold, 2002 ; Van Leeuwen et Samelson, 1999). Ces molécules associées au TCR contiennent des motifs d'activation de tyrosine du récepteur immunologique (ITAM pour « Immunoreceptor-based tyrosine activation motif ») pour l'initiation de la voie de signalisation. Suite à l'engagement du TCR, les résidus tyrosine des motifs ITAMs deviennent rapidement phosphorylés par deux protéines tyrosines kinases de la famille Src, la p56lck et la p59fyn (Thomas et Brugge, 1997). 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. Ces kinases phosphorylent les ITAMs permettant les liaisons avec des protéines contenant des domaines SH2. Ces liaisons induisent 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). Après la phosphorylation des ITAMs, la protéine tyrosine kinase ZAP-70, une protéine cytosolique, est premièrement recrutée puis activée par phosphorylation.

La protéine va à son tour activer plusieurs substrats, dont la molécule adaptatrice transmembranaire LAT et la protéine adaptatrice cytosolique SLP-76. L'activation de ces deux protéines mène non seulement à la réorganisation du cytosquelette mais également à l'activation de certaines voies signalétiques. En effet, LAT et SLP-76 servent de protéines d'ancrage pour d'autres molécules dont Grb2, GADS, la sous-unité p85 de PI3K et la PLC- γ . La protéine Grb2 joue un rôle important comme adaptateur pour l'activation de molécules. En effet, Grb2 lie Sos, un facteur d'échange nucléotidique de la petite protéine G Ras, ce qui permet l'activation de Ras avec l'aide de RasGRP (Nel *et al.*, 1995 ; Weil et Israël, 2006).

Suite à cet engagement du TCR, trois principales voies de signalisation sont activées (Figure 11) : la voie phospholipase C- γ 1/Protéine kinase C (PLC- γ 1/PKC), la voie PI3K-Akt ainsi que l'activation des protéines kinases activées par des mitogènes les MAPKs (« Mitogen-activated protein »). La PLC- γ 1 est une des protéines recrutées par LAT et elle permet la libération de deux seconds messagers le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) par le clivage du phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP₂), un résidu phospholipide membranaire. Le DAG active, entre autres, les divers isoformes de PKC et RasGRP tandis que le facteur IP₃ provoque la libération de Ca²⁺ dans le cytoplasme en se liant à son récepteur IP₃-R au réticulum endoplasmique. La mobilisation du calcium entraîne l'activation de la phosphatase calcineurine. L'activation des isoformes de PKC mène à l'activation du facteur de transcription NF- κ B tandis que la calcineurine mène plutôt à l'activation du facteur nucléaire des cellules T activées, c'est-à-dire le facteur de transcription NF-AT (Kiefer, Vogel et Arnold, 2002 ; Yang et Kazanietz, 2003 ; Weil et Israël, 2006).

La protéine PI3K est constituée d'une sous-unité régulatrice p85 contenant deux domaines SH2 et d'une sous-unité catalytique, p110. Lorsque PI3K devient phosphorylée elle subit un changement de conformation qui active la sous-unité catalytique. Le principal substrat de PI3K est PIP₂ qui génère des seconds messagers provenant des lipides membranaires le PI(3,4,5)P₃, le PI(3,4)P₂ et le PI3P. Ces seconds messagers vont promouvoir la survie cellulaire, la prolifération et la synthèse protéique en activant

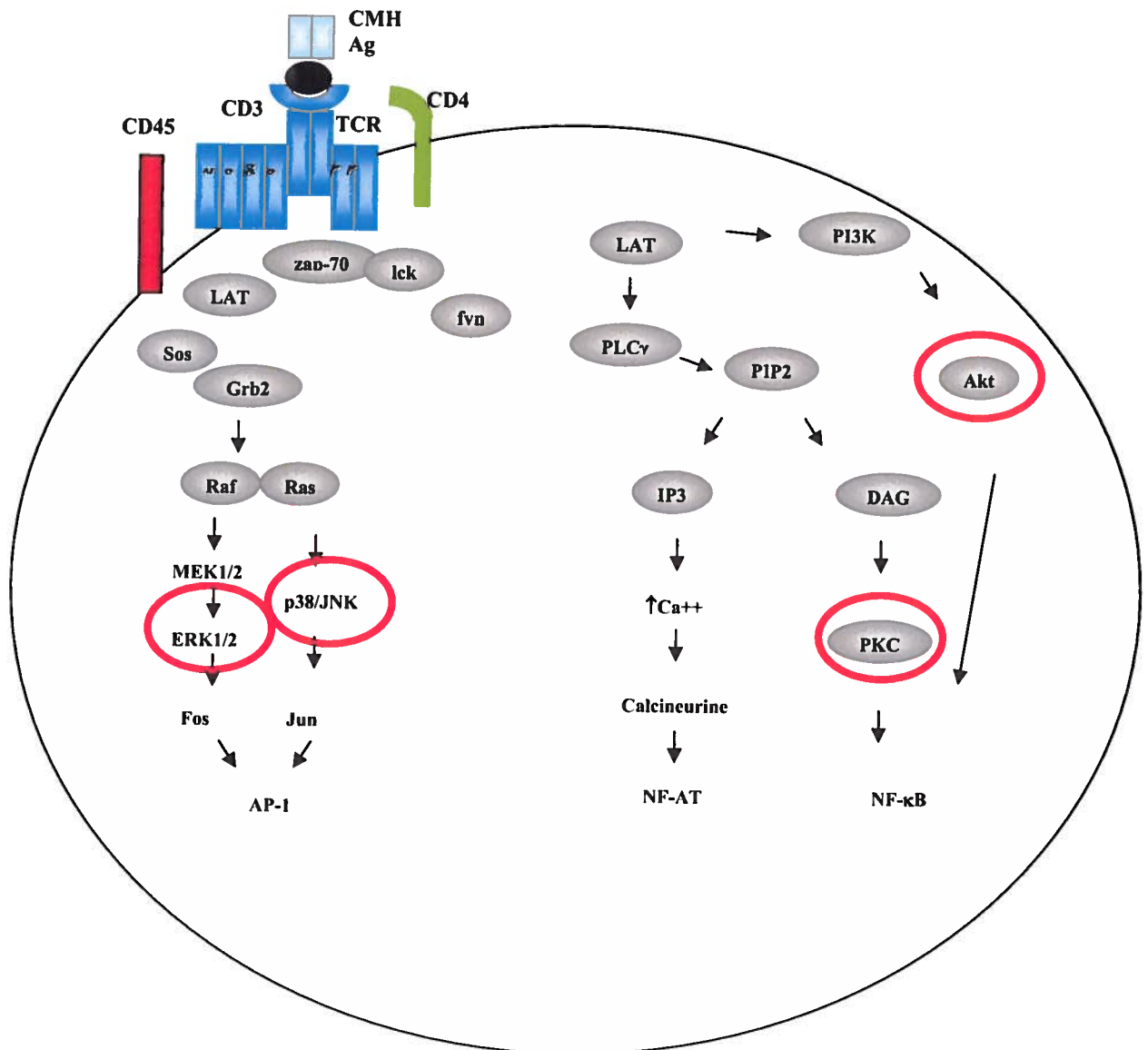


Figure 11 : Voies de signalisation induite lors de la stimulation antigénique du TCR. Suite à l'engagement du TCR, trois principales voies de signalisation sont activées : la voie PLC- γ 1/PKC, la voie PI3K-Akt ainsi que l'activation des MAPKs. La PLC- γ 1 est une des protéines recrutées par LAT et elle permet la libération de DAG et de IP₃. Le DAG active entre autres les divers isoformes de PKC tandis que le facteur IP₃ provoque la libération de Ca²⁺ permettant l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et NF-AT respectivement. Lorsque PI3K devient phosphorylé elle subit un changement de conformation qui active la sous-unité catalytique. Le principal substrat de PI3K est PIP₂ qui génère des seconds messagers. Ces seconds messagers vont promouvoir la survie cellulaire en activant d'autres molécules dont Akt/PKB qui activent, entre autres, le facteur de transcription NF- κ B. Les protéines Ras et Raf activent les MAPKs p38, Erk-1/-2 et JNK-1/-2. L'activation des MAPKs entraîne la formation du complexe AP-1. (Adapté de Koretzky et Myung, 2001)

d'autres molécules dont le proto-oncogène Akt/PKB qui activent, entre autres, NF- κ B (Kiefer, Vogel et Arnold, 2002 ; Weil et Israël, 2006).

Lors de la stimulation antigénique du TCR, les protéines Ras et Raf activent les MAPKs. Les MAPKs sont activées par des MAP kinase kinases (MAPKK) : Erk par MEK-1 et MEK-2, p38 par MKK3 et MKK6 et JNK par MKK4, MKK7. Ces MAPKK sont activées par des MAP kinase kinase kinases (MAPKKK). Les différentes MAPKs possèdent plusieurs fonctions dont le contrôle de la survie cellulaire, la régulation de la prolifération et l'induction de l'expression de gènes suite des stimuli extracellulaires. L'activation des MAPKs entraîne la formation du complexe AP-1, un facteur de transcription ayant un rôle dans l'expression de cytokines (Chang et Karin, 2001 ; Kiefer, Vogel et Arnold, 2002).

2.4 Rôle du CD45 chez les 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 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; Hermiston, Zikherman et Zhu, 2009). Des souris déficientes en 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 mènent à une lymphopénie et une anergie des lymphocytes T (Byth *et al.*, 1996). Ces lymphocytes T possèdent plusieurs déficiences dont dans la phosphorylation sur les résidus tyrosine suite à une stimulation du TCR, dans l'activation de la protéine kinase C,

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 pour « severe combined immunodeficiency »), 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.

2.4.1 Régulation de la famille Src par le CD45 chez les lymphocytes T

La nécessité du CD45 dans l'activation des lymphocytes est due à sa régulation de membres de la famille Src, impliquées au tout début de la signalisation intracellulaire. La famille Src comprend neuf membres, exprimés ubiquitairement (Src, Fyn, Yes) ou selon le type de cellule (Fgr, Lyn, Hck, Lck, Blk, Yrc) (Arold *et al.*, 2001; Kopetz, Shah et Gallick, 2007). 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 (SH pour « Src homology region ») qui contient des signaux de régulation pour la myristoylation, 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 (Thomas et Brugge, 1997 ; Tatosyan et Mizenina, 2000). 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 (Chiarugi, 2008).

Chez les lymphocytes T, le CD45 régule deux membres de la famille Src, la p56lck et la p59fyn. La protéine p56lck 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 p59fyn 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 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 représentant 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). Le CD45 est principalement considéré comme un régulateur positif en déphosphorylant la tyrosine en C-terminale. L'action opposée du CD45 et de la kinase Src C-terminale nommée Csk (pour « C-terminal Src kinase ») détermine l'activité des kinases (Figure 12) (Hermiston, Zikherman et Zhu, 2009). La phosphorylation de la tyrosine C-terminale, en position 505 chez p56lck, par Csk mène à une interaction intramoléculaire avec le domaine SH2 qui inhibe l'activité de p56lck par une *trans*-autophosphorylation de la tyrosine, en position 394 dans son domaine catalytique (Rao *et al.*, 2002a). 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'expression de p56lck avec une mutation de la tyrosine C-terminale 505, qui est constitutivement active (LckF505), peut rétablir le développement des lymphocytes T chez des souris déficientes pour l'expression du CD45 (Seavitt *et al.*, 1999). Ce rétablissement démontre le rôle de régulateur positif du CD45 sur la p56lck. Toutefois, le CD45 serait aussi un rôle de régulateur négatif en déphosphorylant la tyrosine dans le domaine kinase de p56lck (Thomas et Brown, 1999). En effet, il a démontré que la p56lck des lymphocytes T déficients pour l'expression du CD45 est hyperphosphorylée et que son activité serait augmentée de deux à quatre fois (Burns *et al.*, 1994 ; Ashwell et D'Oro, 1999). Les lymphocytes déficients pour l'expression du CD45 exprimant la forme LckF505, démontrent une p56lck plus active avec une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine 394 dans le domaine kinase démontrant le rôle de régulateur négatif du CD45 (Seavitt *et al.*, 1999). Les fonctions spécifiques du CD45

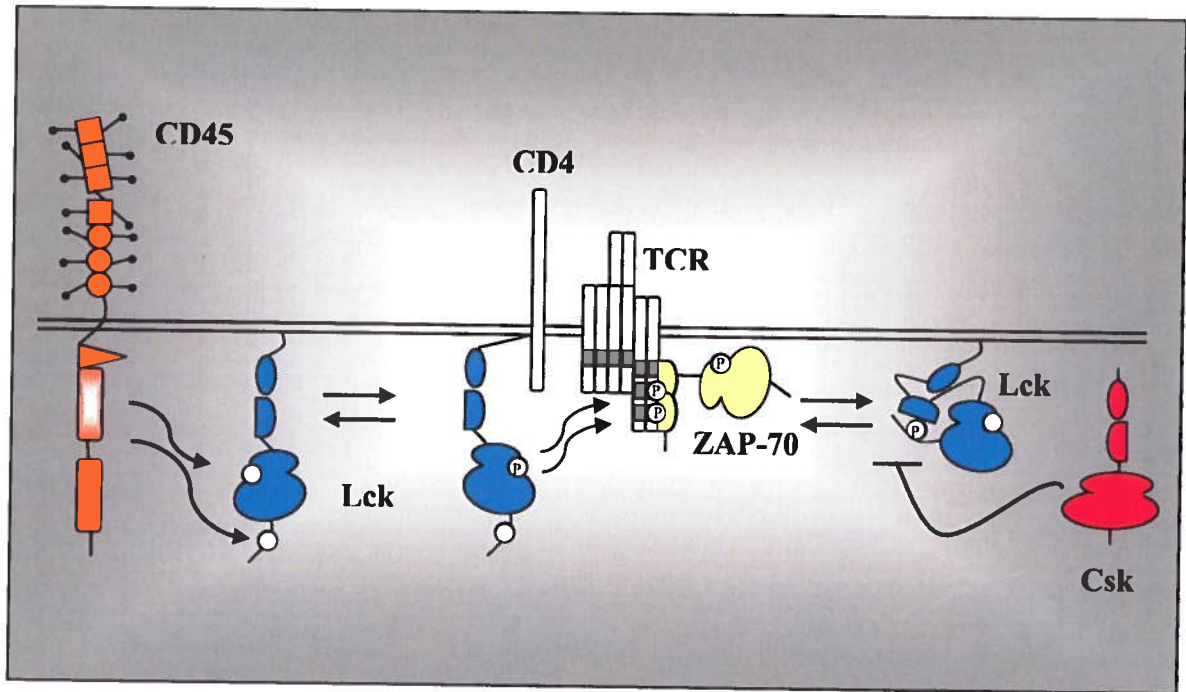


Figure 12 : Régulation réciproque de la protéine tyrosine kinase p56lck par le CD45 et Csk. Le CD45 peut déphosphoryler la région d'autophosphorylation située dans le domaine kinase et la région tyrosine en C-terminale de la p56lck. La kinase active peut phosphoryler les ITAMs du CD3 et des chaînes ζ permettant la phosphorylation de ZAP-70 et la propagation des événements de signalisations intracellulaires. La protéine tyrosine kinase p56lck peut être inactivée par la phosphorylation de sa tyrosine en C-terminale médiée par Csk. (Adapté de Hermiston, Xu et Weiss, 2003)

comme régulateur des membres de la famille Src restent donc à être approfondies pour connaître les circonstances de la régulation positive et négative des membres de la famille Src par le CD45.

2.4.2 Autres mécanismes de régulation par le CD45

Chez les cellules T et B, il a été déterminé que l'activité enzymatique du CD45 est cruciale pour plusieurs événements dont l'induction de la phosphorylation par les récepteurs d'antigènes, l'hydrolyse de PIP₂, l'activation de Ras et Vav-1, la mobilisation du calcium, le développement, la prolifération et la production de cytokines (Penniger *et al.*, 2001). Étant donné l'importance de la tyrosine phosphatase CD45 dans la régulation de plusieurs événements biochimiques, il est surprenant que si peu de substrats lui aient été attribués. Malgré tout, en plus des membres de la famille Src, quelques autres substrats du CD45 ont été identifiés. Le CD45 peut interagir et déphosphoryler les tyrosines sur la chaîne ζ du TCR (Frearson et Alexander, 1996). Puisque la phosphorylation de tyrosines sur les chaînes ζ du TCR recrute les protéines tyrosine kinases de la famille Syk pour l'amplification du signal, la déphosphorylation des chaînes ζ 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 des résidus tyrosines (Mustelin *et al.*, 1995). Il a également été déterminé que le CD45 est une Janus kinase (Jak) phosphatase qui régule négativement la signalisation des récepteurs aux cytokines (Irie-Sasaki *et al.*, 2001). En effet, le CD45 déphosphoryle directement des résidus tyrosines localisés dans la boucle d'activation des quatre membres de la famille Jak, c'est-à-dire Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2. La déphosphorylation des Jaks induit une diminution de leur activité impliquée dans la différenciation, la prolifération et l'immunité antivirale des cellules hématopoïétiques (Penninger *et al.*, 2001).

Une récente étude a rapporté un rôle tout à fait inattendu au domaine intracellulaire du CD45. En effet, chez l'humain, le CD45 exprimé chez les monocytes et granulocytes est séquentiellement clivé par des sérines/métalloprotéinases et des gamma-sécrétases durant leur activation par des stimuli fongiques et par un stimulus chimique le phorbol-12-

myristate-13-acétate (PMA). Le clivage du CD45 induit la libération d'un fragment de 95 kDa comprenant la queue cytoplasmique du CD45. Étant donné la présence d'un récepteur sur les cellules T préactivées et l'inhibition de la prolifération de ces cellules T en présence de ce fragment, les auteurs ont suggéré que la libération du domaine intracellulaire du CD45 provenant des phagocytes pourrait fonctionner comme un régulateur intercellulaire de l'activation des cellules T (Kirchberger *et al.*, 2008).

2.5 Régulation de l'activité du CD45

Quelques études ont démontré que l'activité du CD45 peut être régulée par phosphorylation et déphosphorylation, ce qui module l'activité phosphatase de la molécule (Yamada *et al.*, 1990; Stover *et al.*, 1991; Ostergaard et Thowbridge, 1991). La phosphorylation du CD45 serait induite après une stimulation de la cellule et représenterait donc un mécanisme pour diminuer l'activation de la cellule (Yamada *et al.*, 1990). Peu d'effecteurs de ce mécanisme de régulation ont été identifiés, sauf pour la caséine kinase 2 (CK2). En effet, le CD45 possède quatre résidus sérines dans le domaine D2 qui peuvent être phosphorylés par la CK2 modulant son activité (Wang *et al.*, 1999; Greer *et al.*, 2001). D'autres études sont requises pour identifier d'autres régulateurs potentiels de l'activité du CD45 par le mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation. Le CD45 peut être un régulateur positif et négatif de p56lck et la régulation des activités opposées du CD45 demeure toujours inconnue (Takeda, Wu et Maizel, 1992). Toutefois, sa liaison avec une protéine associée au CD45, CD45-AP (pour « CD45-associated protein ») modifie son interaction avec certaines protéines. La protéine CD45-AP est fortement exprimée chez les lymphocytes B et les lymphocytes T. Elle jouerait un rôle d'adaptateur en coordonnant les interactions entre le CD45 et certaines protéines tyrosines kinases dont ZAP-70 et p56lck (Motoya *et al.*, 1999). Les espèces réactives oxygénées ont été reconnues comme pouvant inhiber l'activité phosphatase du CD45 chez les neutrophiles (Fialkow, Chan et Downey, 1997). De plus, l'association du CD45 avec l'enzyme glucosidase II contenant des chaînes catalytiques α et β a été identifiée comme pouvant être un autre 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).

La dimérisation du CD45 a été proposée comme modèle d'inhibition de l'activité du CD45. Il a été suggéré que le CD45 fonctionne en étant un monomère tandis que son homodimérisation inhibe la transduction de signaux (Desai *et al.*, 1993; Bilwes *et al.*, 1996; Majeti *et al.*, 1998; Majeti *et al.*, 2000; Novak *et al.*, 1994; Dornan *et al.*, 2002). La liaison du CD45 à un ligand peut induire une dimérisation. L'inhibition de l'activité du CD45 est causée par la dimérisation des domaines phosphatases où l'activité phosphatase est bloquée par des contacts avec une portion structurale du CD45 juxtaposée, bloquant le domaine catalytique (Penninger *et al.*, 2001). Les études mécanistiques ont démontré que la dimérisation du CD45 est affectée par sa région extracellulaire, c'est-à-dire par la O-glycosylation et la sialylation des exons épissés alternativement (Xu et Weiss, 2002). La glycosylation du CD45 varie selon le type cellulaire et le stage de différenciation de la cellule (Holmes, 2006). Il a été démontré que plusieurs isoformes du CD45 peuvent homodimériser chez des cellules primaires ainsi que chez des cellules transfectées. Il a été établi que l'isoforme RO (celui qui détient le moins de sialylation et de O-glycosylation) dimérise plus rapidement et plus efficacement que l'isoforme RABC. La dimérisation du CD45 diminue la signalisation via le TCR. Il a été proposé que plusieurs jours suivants une stimulation du TCR, les lymphocytes T activés changent l'expression de l'isoforme RA+ pour l'isoforme RO où ce dernier serait utile pour diminuer l'activité phosphatase du CD45 et contribuer à l'arrêt d'une réponse immunitaire (Birkeland *et al.*, 1989; Xu et Weiss, 2002). La glycosylation et la sialylation régulent également l'activité du CD45 en affectant la reconnaissance du CD45 avec ses ligands ce qui influence la réponse biologique de la cellule (Earl et Baum, 2008). En résumé, selon l'expression des différents isoformes du CD45 les événements de signalisation vont être influencés, mais le rôle précis de chaque isoforme reste quand même à être précisé.

2.6 Implication du CD45 dans l'apoptose des cellules du système immunitaire

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. Cependant le rôle de régulateur de la survie et de l'apoptose émerge de plus en plus pour le CD45.

2.6.1 Induction de l'apoptose par la liaison du CD45 par des anticorps monoclonaux

Il a été démontré que la liaison de la portion extracellulaire du CD45 avec des anticorps monoclonaux (anti-CD45) peut induire l'apoptose des thymocytes, des cellules T, des cellules B et des éosinophiles (Blaylock, Sexton et Walsh, 1999; Lesage *et al.*, 1997; Ogimoto *et al.*, 1994; Klaus, Sidorenko et Clark, 1996). Klaus, Sidorenko et Clark, (1996) ont aussi démontré que les cellules T sont également sensibles à ce type d'induction de l'apoptose par la liaison du CD45 avec des anticorps monoclonaux insolubles. L'apoptose induite par la liaison du CD45 chez les cellules B et T est caractérisée par des signes morphologiques typiques comme un bourgeonnement de la membrane plasmique et une condensation de la chromatine (Klaus, Sidorenko et Clark, 1996). Fait intéressant, certaines études ont montré que l'induction de l'apoptose par la liaison du CD45 à l'aide d'anticorps n'induit pas de fragmentation internucléosomale de l'ADN (Klaus, Sidorenko et Clark, 1996; Lesage *et al.*, 1997). Chez les lymphocytes B et les lymphocytes T, cette voie d'induction de l'apoptose semble être dépendant de tyrosine kinases et phosphatases puisque l'apoptose est bloquée par l'ajout d'inhibiteurs spécifiques de protéines tyrosine kinases et de protéines tyrosines phosphatases. Par contre, l'ajout d'inhibiteurs de la synthèse d'ARN et de la synthèse protéique ne permet pas l'inhibition de cette mort par apoptose (Klaus, Sidorenko et Clark, 1996).

Lesage *et al.*, (1997) ont démontré l'induction de l'apoptose par le CD45 chez des thymocytes. La liaison du CD45 par des anticorps monoclonaux mène à l'apoptose caractérisée par la réduction du potentiel mitochondrial, la production d'espèces réactives oxygénées, la perte de l'asymétrie membranaire et l'exposition des résidus de

phosphatidylsérine. Similairement à l'étude effectuée par Klaus, Sidorenko et Clark (1996), l'induction de l'apoptose n'a pas mené à une fragmentation internucléosomale de l'ADN. De plus, cette 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. Par contre, l'apoptose a été inhibée par un antioxydant qui supprime la production d'espèces réactives oxygénées. 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 élucidée. 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 chez des thymocytes (Fortin *et al.*, 2002). En effet, des lignées cellulaires de thymocytes exprimant un mutant du CD45 où l'activité phosphatase est non fonctionnelle (C817S) ou un mutant où presque toute la région cytoplasmique (incluant les domaines phosphatases) est absente, 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). De plus, l'apoptose induite par le CD45 est détectée chez des thymocytes déficients pour la protéine LPAP (« lymphocyte phosphatase associated phosphoprotein »), l'homologue humain de CD45-AP, indiquant que cette molécule n'est pas nécessaire dans l'apoptose induite par le CD45 (Fortin *et al.*, 2002). L'implication de certains types d'interaction entre le domaine extracellulaire du CD45 et d'autres molécules de surface reste à être déterminée. Toutefois, le fait que le CD45 devient associé à la fraction insoluble au détergent après sa liaison, indique une possible association avec le cytosquelette et suggère un mécanisme par lequel le CD45 pourrait

être mis en contact avec des substrats potentiels régulant l'apoptose (Klaus, Sidorenko et Clark, 1996)

2.6.2 La liaison du CD45 par des ligands induit l'apoptose

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). Cette galectine est impliquée dans une variété de processus cellulaires dont l'adhésion cellulaire, la régulation de la croissance, l'inflammation, l'apoptose, l'embryogenèse et la progression du cancer (Fajka-Boja *et al.*, 2005). La galectine-1 est distribuée dans plusieurs tissus dont le thymus, les ganglions lymphatiques, la rate, la prostate, les poumons, le placenta et la peau (Perillo *et al.*, 1998). La galectine-1 est aussi 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, 2004). 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 indépendamment du récepteur de mort Fas, des stéroïdes et de la voie de signalisation du CD3 (Nguyen *et al.*, 2001 ; Perillo *et al.*, 1995; Perillo *et al.*, 1997; Vespa *et al.*, 1999). Il a été déterminé que la galectine-1 provenant du placenta et de cellules épithéliales était un ligand naturel pour la phosphatase CD45 (Perillo *et al.*, 1995; Walzel *et al.*, 1999). Plusieurs molécules de la galectine-1 peuvent lier des résidues N-acétylactosamine sur les oligosaccharides présents sur une molécule du CD45 (Symons, Cooper et Barclay, 2000). Chez les cellules T actives et chez des lignées cellulaires leucémiques, la liaison de la galectine-1 induit l'apoptose d'une manière dépendante du CD45 (Perillo *et al.*, 1995). Chez les cellules T Jurkat, la galectine-1 stimule l'expression à la surface cellulaire des résidus de phosphatidylsérine, un indicateur précoce de l'apoptose. Toutefois, la galectine-1 induit des niveaux plus élevés de résidus de phosphatidylsérine chez les cellules Jurkat CD45+, comparativement

aux cellules Jurkat CD45- (Walzel *et al.*, 1999). Les mécanismes et événements biochimiques de l'apoptose induite par la galectine-1 ont été très peu caractérisés. Toutefois, contrairement à l'induction de l'apoptose à l'aide d'anticorps ciblant le CD45, l'apoptose induite par la galectine-1 démontre une fragmentation internucléosomale de l'ADN. Il a aussi été démontré que la galectine-1 induit l'apoptose de thymocytes humains (Perillo *et al.*, 1997). Parmi les différents sous-types de thymocytes, les CD4^{faible}CD8^{faible} sont plus sensibles à l'induction de l'apoptose par la galectine-1, le même sous-type sensible à l'induction de l'apoptose par la liaison du CD45 avec des anticorps monoclonaux (Perillo *et al.*, 1997; Lesage *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent que la galectine-1 serait impliquée dans le processus de maturation des thymocytes *in vivo* (Perillo *et al.*, 1997). Puisque les thymocytes immatures CD4⁺CD8⁺ expriment principalement des isoformes du CD45 de faible poids moléculaire, le niveau de glycosylation du CD45 pourrait influencer sa liaison avec le CD45 (Wallace *et al.*, 1992). Chez l'humain, l'isoforme CD45RO semble être le principal isoforme interagissant avec la galectine-1 (Perillo *et al.*, 1995; Baum *et al.*, 1995). L'ajout de galectine-1 à des lymphocytes alloréactifs résulte à l'apoptose des cellules exprimant l'isoforme CD45RO (Rabinovich *et al.*, 2002). L'ampleur de la liaison de la galectine-1 versus les différents isoformes du CD45 et la glycosylation du CD45 n'a pas été largement étudiée, mais il peut être suggéré que des encombrements stériques provenant de la glycosylation régule la liaison de la galectine-1 au CD45. En effet, il a été montré que la présence de O-glycosylation comportant un groupement glucosaminyle en position core-2 sur l'isoforme CD45RO est essentiel à la mort cellulaire induite par la galectine-1 en facilitant sa liaison et sa co-localisation sur la membrane plasmique (Nguyen *et al.*, 2001).

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 être éclairci. 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 (Perillo *et al.*, 1997 ; Pace *et al.*, 1999). La participation du CD43 et du CD7 pourrait 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. Il a également été démontré que l'activité du CD45 est inhibée lors de l'apoptose induite par la galectine-1 mettant en doute l'implication de cette phosphatase (Amano *et al.*, 2003; Fouillit *et al.*, 2000).

D'autres molécules ont été démontrées comme pouvant être des ligands potentiels du CD45. La galectine-3 et la galectine-9 sont d'autres galectines qui peuvent induire la mort cellulaire chez les thymocytes. Tandis que l'induction de la mort cellulaire par la galectine-9 ne requière pas l'expression du CD45, le CD45 semble être impliqué dans la mortalité induite par la galectine-3 (Stillman *et al.*, 2006; Bi *et al.*, 2008; Wada *et al.*, 1997). Le CD22, une protéine transmembranaire de la superfamille de immunoglobulines exprimé chez les cellules B, a été identifié comme un ligand potentiel du CD45 (Sgroi *et al.*, 1993; Sgroi, Koretzky et Stamenkovic, 1995). Par contre, le CD22 est un type de lectine liant les N-glycosylations qui détiennent des résidus d'acide sialique et peut donc lier plusieurs autres molécules. En outre, il a aussi été rapporté que le CD45 peut physiquement s'associé avec des molécules de surface comme Thyl, CD2, CD4, LFAI, TCR et le récepteur de la chaîne α de l'interféron (Altevogt *et al.*, 1990; Penninger *et al.*, 2001). Ces interactions ne sont pas encore bien comprises et ne semblent pas induire la mort cellulaire. Récemment, Ma *et al.*, (2008) ont signalé que la lectine jacalin induit l'apoptose des cellules B par le biais d'interactions dépendantes de la glycosylation avec le CD45. Jacalin est une lectine provenant des graines de fruit du jacquier et serait un ligand pour les isoformes du CD45 sur les lymphocytes B. L'induction de l'apoptose par Jacalin chez les cellules B implique une mobilisation du calcium et l'activation des calpaïnes, ce qui suggère que l'induction de l'apoptose par ce ligand implique une voie calcium/calpaïnes. L'apoptose est bloquée par un inhibiteur spécifique du CD45,

indiquant que jacalin induit l'apoptose des cellules B via le CD45. Dans les cellules T, en se liant au CD45 cette lectine provoque plutôt une augmentation de l'activation des lymphocytes T en réponse à la liaison du TCR et à une co-stimulation du CD28 (Baba *et al.*, 2007). Ainsi, l'induction de l'apoptose par jacalin serait dépendante du type cellulaire. *In vivo*, les interactions du CD45 avec ses ligands semblent dépendants de plusieurs facteurs dont l'expression de différents isoformes, le type cellulaire ainsi que le niveau de différenciation cellulaire.

2.6.3 Implication du CD45 dans l'induction de l'apoptose par la voie des récepteurs de mort

Il a été démontré que l'activation de protéines tyrosine kinases est impliquée dans la signalisation apoptotique médiée par le récepteur Fas (Eischen; Dick et Leibson, 1994; Zong *et al.*, 2004; Szabo *et al.*, 1996). Il est également connu que l'inhibition des tyrosines phosphatases est un antagonisme à l'apoptose induite par Fas (Hegner *et al.*, 1999). La p56lck est un des principaux substrats du CD45, conséquemment l'implication du CD45 et de la p56lck a été évaluée lors de l'induction de l'apoptose médiée par Fas (Schraven et Peter, 1995; Latinis et Koretzky, 1996). 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 p56lck 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 suite à l'induction de l'apoptose par Fas. Ces résultats démontrent que la signalisation médiée par Fas ne requière pas l'activité de la p56lck ou du CD45. Toutefois, la lignée cellulaire utilisée qui est 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 8 % de l'expression normale du CD45 (Koretzky *et al.*, 1991). D'autres études devraient donc être complétées avec une lignée cellulaire complètement déficiente pour l'expression du CD45 afin de déterminer si cette phosphatase aurait un rôle à jouer dans la voie de signalisation de Fas.

Dans un autre contexte, 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 (Bleesing *et al.*, 2001). L'expression de l'isoforme B220 est augmentée durant la transition de la prolifération à l'état d'anergie et l'expression est à son maximum sur les cellules T lorsqu'elles meurent par apoptose (Alexander, 2000; Bleesing *et al.*, 2001). 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 phénomène soulève la question si l'expression de l'isoforme B220 est impliquée dans l'élimination de la cellule à la fin de l'activation de la cellule. Le type et la structure exact de l'isoforme du CD45 détecté chez les cellules T humaines sont inconnus, mais cet isoforme semble détenir les trois portions extracellulaires encodées par les exons A, B et C. De plus, la liaison de lectines à cet isoforme B220 sur les cellules T activées a révélé l'importance de O-glycosylations comportant un groupement glucosaminyle en position core-2 ce qui affecte le CD45 (Bleesing *et al.*, 2001). Il a préalablement été démontré que l'augmentation de la sialylation à la surface des cellules joue un rôle dans la modulation de la sensibilité à l'apoptose par la voie de Fas (Peter *et al.*, 1995; Keppler *et al.*, 1999). Donc, les modifications glucidiques sur le CD45 pourraient influencer l'apoptose par Fas. L'implication de l'expression de cet isoforme dans l'induction de l'apoptose reste toutefois à être déterminée.

2.6.4 Implication du CD45 dans l'apoptose induite par la voie mitochondriale

Très peu d'études ont été effectuées sur le rôle du CD45 dans l'apoptose induite par les produits chimiques tels que les drogues utilisées en chimiothérapie ou les polluants de l'environnement. Notre laboratoire a montré que le CD45 régule l'apoptose induite par des perturbateurs mitochondriaux comme le tributylétain (TBT) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Dupéré-Minier *et al.*, 2004; Desharnais *et al.*, 2008). Le TBT est un biocide utilisé dans les peintures antisalissures qui provoque de puissants effets immunotoxiques sur le système immunitaire des mammifères, caractérisé *in vivo* par l'atrophie du thymus et de la réduction des lymphocytes périphériques, par des effets anti-prolifératifs et l'induction de l'apoptose (Raffray et Cohen, 1993; Gennari *et al.*, 1997).

In vitro, le TBT induit l'apoptose de plusieurs types de lignées de cellules lymphoïdes et promyeloïdes (Stridh *et al.*, 1998; Stridh, Orrenius et Hampton, 1999; Thompson *et al.*, 1996). Le TBT induit l'apoptose dans les lignées de cellules lymphoïdes par la voie classique mitochondriale (Stridh *et al.*, 1998) Les résultats obtenus dans notre laboratoire montrent que le CD45 est impliqué dans la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN des cellules T induites en apoptose par le TBT (Desharnais *et al.*, 2008). En effet, lorsqu'elles sont exposées au TBT, les lignées de cellules déficientes pour l'expression du CD45 sont résistantes à l'apoptose nucléaire contrairement aux cellules normales CD45 positives. L'implication de la tyrosine phosphatase CD45 dans l'inhibition de l'apoptose nucléaire a été confirmée par la transfection du CD45 chez les cellules CD45-, qui a rétabli la fragmentation de l'ADN après exposition au TBT. Bien qu'il y ait absence d'apoptose nucléaire chez les cellules CD45-, plusieurs caractéristiques d'activation de l'apoptose sont détectables chez ces cellules. En effet, suite à l'exposition à l'agent perturbateur, il y a chez les cellules CD45+ et CD45-, une mobilisation du calcium intracellulaire, une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial, la libération du cytochrome c, l'activation de la caspase-3 et le clivage du DFF40. De plus, lors d'expériences de fractionnements cellulaires, il a été démontré qu'il y a une diminution de la localisation nucléaire de la caspase-3 ainsi que du DFF40. Des analyses *in vitro* (« cell-free system ») ont révélé que le défaut de signalisation responsable de l'absence de l'apoptose nucléaire chez les cellules CD45- était localisé dans le cytoplasme en aval de l'activation de la caspase-3. Malgré que l'absence de l'apoptose nucléaire a également été observée suite à une exposition au H₂O₂, l'implication du CD45 dans l'apoptose nucléaire est dépendante du type d'inducteur puisque l'exposition à la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, mène à une fragmentation de l'ADN chez les cellules déficientes pour l'expression du CD45. Des cellules T déficientes pour l'expression de p56lck, ZAP-70 ou SHP-1 démontrent de l'apoptose nucléaire excluant l'implication possible à eux seules des deux substrats du CD45, p56lck et ZAP-70 ainsi que d'une autre tyrosine phosphatase, SHP-1. Il a aussi été démontré que le CD45 joue un rôle important dans l'apoptose nucléaire par la régulation de l'homéostasie ionique de la cellule (Dupéré-Minier *et al.*, 2004). Une perturbation du transport des ions lors de l'apoptose conduit à des changements dans les niveaux

intracellulaires des ions et perturbe l'activité de certaines enzymes. Les résultats montrent une perturbation de l'homéostasie ionique chez les lymphocytes T déficients pour l'expression du CD45 contrairement aux lymphocytes normaux. En effet, lors de l'induction de l'apoptose, les cellules CD45- ont perdu leur capacité à réduire leur volume cellulaire et il y a également absence d'acidification intracellulaire, deux processus requis pour la fragmentation de l'ADN (Maeno *et al.*, 2000; Szabo *et al.*, 1998). Chez les cellules CD45-, il y a également absence d'exposition des résidus de phosphatidylsérine à la surface cellulaire. L'absence d'exposition des résidus de phosphatidylsérine n'est pas surprenant, étant donné que l'acidification intracellulaire a été démontré comme étant nécessaire dans ce processus (Meisenholder, Martin, Green *et al.*, 1996). Nos résultats sont cohérents avec Walzel *et al.*, 1999, qui a prouvé que la galectine-1 induit des niveaux plus élevés de résidus phosphatidylsérine chez les cellules CD45+ en comparaison avec les cellules Jurkat déficientes pour le CD45. Il a été aussi démontré que des lymphocytes T exprimant faiblement l'isoforme CD45RB, ainsi que des cellules B déficientes pour le CD45, expriment constitutivement des résidus de phosphatidylsérine à leur surface cellulaire (Elliott *et al.*, 2005, Elliott *et al.*, 2006). Il a été suggéré que le CD45 pourrait inhiber la redistribution de ces résidus en réponse à divers signaux non-apoptotiques (Elliott *et al.*, 2005). Ces études confirment un rôle potentiel du CD45 dans le processus d'exposition des résidus de phosphatidylsérine à la surface cellulaire. Il a également été démontré que les niveaux de phosphorylation des résidus tyrosine sur les canaux de chlore sont considérablement inhibés chez les cellules CD45- (Dupéré-Minier *et al.*, 2004), suggérant la perte de leur activation en accord avec la perte de la réduction du volume et de l'acidification intracellulaire qui sont contrôlées par les canaux de chlore (Okada et Maeno, 2001). Il a préalablement été démontré que l'inhibition d'un efflux de chlore inhibe la fragmentation de l'ADN (Kawane *et al.*, 2003). Il a été démontré que l'exposition des cellules CD45- à un milieu hypotonique, ce qui induit un efflux de chlore, augmente de manière significative la fragmentation de l'ADN chez ces cellules démontrant la perturbation des canaux de chlore. Il est déjà connu que la régulation des canaux de chlore est effectuée, entre autres, par p56lck et p59fyn deux principaux substrats du CD45 (Lepple-Wienhues *et al.*, 1998; Edwards et Kapadia, 2000). Ces résultats démontrent l'implication du CD45 dans la régulation de la

fragmentation internucléosomale et la condensation de la chromatine lors de l'apoptose induite par la voie mitochondriale.

Deux autres études ont évalué l'induction de l'apoptose par la voie mitochondriale chez des cellules déficientes pour le CD45. Anand et Ganju (2006) ont évalué l'apoptose nucléaire par la méthode TUNEL (« terminal dUTP nick-end labeling ») chez la lignée cellulaire J45.01 (8% de l'expression basale du CD45) exposée à la staurosporine (inhibiteur de protéines kinases), à des radiations ionisantes, à des anticorps anti-CD3 ainsi qu'à des anticorps anti-Fas. L'apoptose nucléaire chez ces cellules était normale confirmant qu'une faible expression du CD45 est suffisante pour induire une fragmentation de l'ADN. Récemment, Liu *et al.* (2006) ont démontré que des lignées de cellules de myélome CD45+ sont plus sensibles à divers stimuli apoptotiques comme un stress oxydatif ou un stress au niveau du réticulum endoplasmique. L'augmentation de la susceptibilité à l'apoptose chez ces cellules CD45+ était accompagnée d'une augmentation de l'expression de la porine mitochondriale VDAC1. La figure 13 résume les événements biochimiques chez les cellules CD45- après induction de l'apoptose par des perturbateurs mitochondriaux.

2.6.5 Participation du CD45 dans l'apoptose induite par le VIH

Lors de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine-1 (VIH-1) une importante conséquence est la diminution du nombre de cellules T CD4+ suite à l'induction de l'apoptose, ce qui cause une immunodéficience sévère fatale. Le mécanisme par lequel l'infection par le VIH induit la mortalité des cellules T est un des sujets les plus controversés dans la recherche sur ce virus. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'induction de l'apoptose par le virus VIH dont la réduction du nombre de cellules voisines non infectées, l'inactivation de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et l'augmentation des niveaux cellulaires de protéines pro-apoptotiques (Shedlock *et al.*, 2008). Guntermann *et al.* (1998), ont démontré que durant l'infection par le VIH, l'activité du CD45 est profondément réduite avec une diminution de la signalisation provenant des tyrosines kinases et une diminution des fonctions de la PLC- γ . Les auteurs

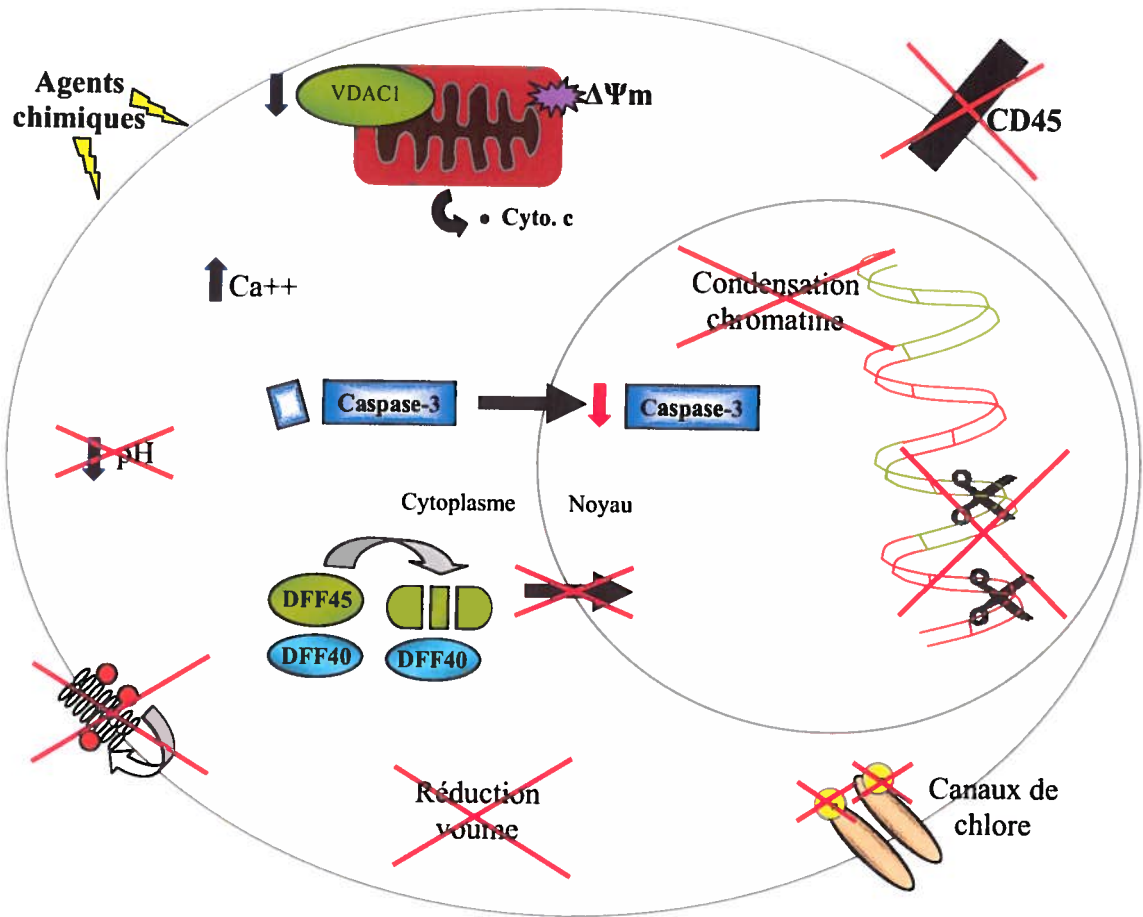


Figure 13: Événements caractérisant les cellules CD45- lors de l'induction de l'apoptose par un perturbateur mitochondrial. Chez les cellules CD45-, il y a absence d'apoptose nucléaire (condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN) malgré la présence d'une dissipation du potentiel mitochondrial, de la libération du cytochrome c, d'une mobilisation du calcium intracellulaire, de l'activation de la caspase-3 et du clivage du DFF45. Par contre, la localisation nucléaire de la caspase-3 et du DFF40 est diminuée et il y a absence d'externalisation des résidus de phosphatidylsérine. L'homéostasie ionique est également perturbée puisqu'il y a absence de réduction du volume cellulaire, absence d'acidification intracellulaire et absence de la phosphorylation des canaux de chlore sur les résidus tyrosine.

ont suggéré que la signalisation provenant du CD3 et du CD4 induirait une réponse proliférative défectueuse en réponse à un antigène ainsi que de l'anergie et l'induction de l'apoptose. La réduction de l'activité tyrosine phosphatase du CD45 correspond avec la progression de la maladie et les niveaux d'apoptose des cellules T (Giovannetti *et al.*, 2000). Plusieurs protéines virales du VIH ont des propriétés apoptotiques dont Tat, Vpr, Nef et gp120 (Env) (Azad, 2000; Roshal, Zhu et Planelles, 2001). Une récente étude a démontré une implication du CD45 dans l'induction de l'apoptose des cellules T par gp120 (Anand et Ganju, 2006). La gp120, une protéine de l'enveloppe du VIH-1, est connue comme pouvant induire l'apoptose par la mort cellulaire suite à l'activation (« activation induced-cell death ») (Banda *et al.*, 1992; Westendorp *et al.*, 1995). Puisque le CD45 joue un rôle essentiel dans la signalisation du TCR, ils ont analysé l'implication du CD45 dans l'induction de l'apoptose par gp120. L'apoptose médiée par gp120 était significativement diminuée chez les cellules déficientes pour l'expression du CD45. Le CD45 modulerait l'induction de l'apoptose médiée par gp120 en régulant l'induction de Fas ligand et via la voie de signalisation PI3K/Akt. Un rôle pour le domaine extracellulaire du CD45 a été proposé puisque l'expression d'une molécule chimérique contenant seulement le domaine intracellulaire n'a pas rétabli l'induction de l'apoptose (Anand et Ganju, 2006). Les résultats obtenus des différents groupes qui ont étudié le rôle du CD45 dans l'apoptose suite à l'infection du VIH sont contradictoires, mais ils semblent tout de même que le CD45 détient bien un rôle.

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE LA THÈSE

Les travaux de notre laboratoire ont permis de démontrer que le CD45 est un joueur important lors de l'apoptose nucléaire induite par des agents perturbant le potentiel mitochondrial. En effet, lors de l'induction de l'apoptose, il y a absence de fragmentation internucléosomale de l'ADN et absence de condensation de la chromatine chez les lymphocytes T déficients pour le CD45. Il a été établi que les canaux de chlore et le maintien de l'homéostasie ionique sont des facteurs importants dans l'absence de l'apoptose nucléaire chez les cellules CD45- (Dupéré-Minier *et al.*, 2004). L'objectif principal de ce projet de thèse est de déterminer le rôle du CD45 dans l'apoptose. L'hypothèse générale de cette thèse est que le CD45 est responsable directement ou indirectement de la régulation d'une voie de contrôle de l'apoptose.

Dernièrement, nous avons démontré que bien qu'il y ait absence d'apoptose nucléaire chez les cellules CD45-, la cascade apoptotique semble bien enclenchée (Desharnais *et al.*, 2008). Ces travaux ont été publiés dans la revue « Apoptosis » et l'article est présenté à l'annexe I. L'objectif général de cet article était d'analyser les principaux événements caractéristiques de l'apoptose chez les cellules exprimant ou non le CD45. Les objectifs plus spécifiques de cet article étaient de : 1- déterminer si la résistance à l'apoptose nucléaire chez les cellules CD45- était spécifique seulement à une lignée cellulaire 2- analyser l'influence de l'expression du CD45 dans l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose 3- déterminer le clivage de molécules effectrices de l'apoptose selon l'expression du CD45 4- vérifier si l'absence du CD45 crée un défaut dans la signalisation au niveau du cytoplasme et/ou au niveau nucléaire 5- analyser la localisation nucléaire de la caspase-3 et du DFF40 en absence de l'expression du CD45. Ainsi, il a été démontré que suite à l'exposition à un perturbateur mitochondrial, il y a chez les cellules CD45+ et CD45-, une perturbation du potentiel mitochondrial associée à la libération de cytochrome C, une augmentation du calcium intracellulaire, une activation de la caspase-3 et le clivage du DFF45. Chez les cellules CD45-, il a été établi qu'il y a un défaut de la signalisation dans le cytoplasme de ces cellules ainsi qu'une perturbation dans la localisation nucléaire de la caspase-3 et du DFF40.

Suite à ces travaux, l'hypothèse générale suivante a été émise : L'absence du CD45 perturbe des événements pouvant réguler l'apoptose nucléaire. L'article I a adressé cette dernière hypothèse. Nous avons démontré dans nos travaux précédents un défaut du clivage d'une protéine nucléaire (Desharnais *et al.*, 2008) chez les cellules CD45-. Nous avons donc premièrement voulu vérifier si l'absence du clivage de molécules, reconnues dans la littérature comme pouvant inhiber la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose, pouvait expliquer cette défaillance chez les cellules CD45-. Pour ce faire, nous avons vérifié le clivage de deux molécules, c'est-à-dire PARP-1 et NuMa. Deuxièmement, étant donné que nos derniers travaux ont démontré chez les cellules CD45- une perturbation dans la localisation nucléaire de molécules impliquées dans l'apoptose, une hypothèse plus spécifique a été émise : Il y a un défaut du transport nucléaire chez les cellules CD45- inhibant l'apoptose nucléaire. Nous avons donc vérifié le démantèlement des pores nucléaires Tpr et NUP153 et nous avons vérifié la localisation nucléaire du DFF40 par immunofluorescence. Puisque le DFF40 est la principale endonucléase responsable de la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose, nous avons émis une 3^e hypothèse plus spécifique : L'expression du CD45 a une influence sur la régulation du DFF40. Pour répondre à cette hypothèse nous avons analysé les différentes formes du DFF40 ainsi que l'implication possible de modifications post-traductionnelles du DFF40 en fonction de l'expression du CD45. Cet article a été soumis dans la revue «Experimental cell research».

Puisque le CD45 est une tyrosine phosphatase en amont de plusieurs protéines kinases, il était essentiel d'analyser les voies de signalisation situées en aval de la régulation du CD45. Notre prochaine hypothèse générale était : En absence de l'expression du CD45, il y a perturbation des voies de signalisation en aval du CD45 qui peuvent conduire à l'absence d'apoptose nucléaire. Nous avons premièrement analysé un événement lors de l'apoptose pouvant avoir un rôle dans l'activation de protéines kinases en aval du CD45, c'est-à-dire la génération de ROS. Deuxièmement, nous avons évalué l'état d'activation des trois principales voies de signalisation en aval du CD45, c'est-à-dire la voie des MAPKs, la voie Akt et l'activation de PKC δ , selon l'expression du CD45. Troisièmement, l'état d'activation du facteur de transcription NF- κ B, impliqué à la fois

dans la régulation positive et négative de l'apoptose, a été étudié. Finalement, des inhibiteurs spécifiques aux différentes kinases ou au facteur de transcription ont été utilisés pour déterminer s'il était possible de rétablir l'apoptose nucléaire. Les résultats de nos travaux pour répondre à ces objectifs sont rassemblés dans l'article II, soumis dans la revue «Carcinogenesis».

SECTION 2 : ARTICLES SCIENTIFIQUES

1.1 ARTICLE I

Objectifs spécifiques de l'article I

Nous avons préalablement démontré une résistance à l'apoptose nucléaire chez les cellules ayant perdu l'expression de la tyrosine phosphatase CD45 (Dupéré-Minier *et al.*, 2004; Desharnais *et al.*, 2008). Ce manuscrit présente les travaux sur le rôle du CD45 dans la régulation des mécanismes responsables de l'apoptose nucléaire.

En comparant les cellules CD45+ et CD45-, les objectifs spécifiques étaient :

- Évaluer le clivage d'autres molécules pouvant inhiber la fragmentation de l'ADN.
- Déterminer le démantèlement des pores nucléaires.
- Déterminer la localisation nucléaire du DFF40 par immunofluorescence.
- Évaluer l'oligomérisation du DFF40.
- Caractériser le DFF40 dénaturé en utilisant différents anticorps ciblant certaines régions du DFF40.
- Identifier des modifications post-traductionnelles du complexe DFF.

Ce manuscrit a été soumis dans la revue *Experimental cell research*.

Contributions à l'article

J'ai effectué toutes les expériences décrites dans cet article. La rédaction de l'article a été accomplie par moi-même avec l'aide du Dr Jacques Bernier.

Résumé français

Contrairement aux cellules T normales (CD45+), les cellules T déficientes pour l'expression du CD45 (CD45-) sont résistantes à l'apoptose nucléaire induite par des agents perturbant la mitochondrie. Le CD45 est une tyrosine phosphatase, une molécule transmembranaire de type 1, qui représente jusqu'à 10% des glycoprotéines de surface et jusqu'à 90% de l'activité phosphatase totale de la cellule. Le CD45 est un régulateur essentiel de voies de signalisation chez les cellules du système immunitaire. Dans cette étude, nous avons exploré l'importance de l'expression du CD45 dans la régulation du DFF40 pour comprendre l'absence d'apoptose nucléaire chez les cellules CD45-. Nos résultats démontrent un clivage normal de deux molécules inhibitrices de l'apoptose nucléaire PARP-1 et NuMa chez les cellules CD45- suite à l'induction de l'apoptose. Par contre, ces cellules possèdent un défaut du démantèlement des pores nucléaires. En utilisant la méthode d'immunofluorescence, nous avons démontré que la localisation nucléaire du DFF40 est perturbée chez les cellules CD45-. Nous avons également identifié la formation d'oligomères du DFF40 chez les cellules CD45+ et CD45- et nous avons démontré que l'état d'oligomérisation du DFF40 diffère selon l'expression du CD45. De plus, l'expression du CD45 est associée avec différentes formes du DFF40. Nous avons également identifié pour la première fois des modifications post-traductionnelles du complexe DFF. Nous avons démontré que le DFF45 est acétylé chez les deux types cellulaires, mais phosphorylé sur résidus tyrosines seulement chez les cellules CD45+ tandis que le DFF40 est acétylé seulement chez les cellules CD45-. Donc, le CD45 joue un rôle significatif dans l'apoptose nucléaire et semble agir sur la régulation du complexe DFF.

Regulation of DFF40 Activity in T Cells Losing CD45 Expression.

Geneviève Dupéré-Minier¹ and Jacques Bernier¹

¹INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7

Corresponding author:

Jacques Bernier
531 boul. des Prairies
INRS-Institut Armand-Frappier
Laval, QC, Canada
H7V 1B7
jacques.bernier@iaf.inrs.ca
450-687-5010 ext 8813
Fax: 450-686-5510

Abstract

Contrary to wild type cells (CD45+), CD45-deficient cells (CD45-) are resistant to nuclear apoptosis induced by mitochondrial perturbing agents. CD45 is a tyrosine phosphatase, a type 1 transmembrane molecule, accounting for more than 90% of the total phosphatase activity, which comprises up to 10% of the cell surface glycoprotein. CD45 is an essential regulator of signal transduction pathways in immune cells. In this study we explored the importance of CD45 expression on the regulation of DFF40 in order to understand the lack of nuclear apoptosis. Our results showed a normal cleavage of two inhibitors of nuclear apoptosis, PARP-1 and NuMa, but a disturbance of nuclear pores cleavage in the CD45-deficient T cell lines. Using immunofluorescence, we showed that DFF40 nuclear localization is disturbed in CD45-deficient cells. We also identified DFF40 oligomers formation in CD45+ and CD45- cells, in which the oligomerization state of DFF40 changes depending on the expression of CD45. Moreover, CD45 expression was associated with different molecular forms of this endonuclease. We showed for the first time post-translational modifications in the DFF complex. We demonstrated that DFF45 is acetylated in both CD45+ and CD45- cells and phosphorylated on tyrosine residues only in CD45+ cells and that DFF40 is acetylated only in CD45- cells. Thus, CD45 plays a significant role in nuclear apoptosis and appears to act on the regulation of the DFF.

Keywords: CD45, Apoptosis, DNA fragmentation, nuclear pore complex, DFF40

Abbreviations: DFF35, DNA fragmentation factor 35; DFF40, DNA fragmentation factor 40; DFF45, DNA fragmentation factor 45; NLS, nuclear localization signal; PARP-1, poly (ADP-ribose) polymerase 1; TBT, tributyltin; TCR, T cell receptor;

Introduction

Apoptosis is a highly conserved process of programmed cell death, which is required for cell life span, normal development and tissue homeostasis [1]. Abnormalities of this finely regulated machinery are implicated in the pathogenesis of several human diseases such as viral infection, auto-immunity, neurodegenerative diseases, acquired immunodeficiency disease (AIDS) and cancer [2]. Dying apoptotic cells share many morphological features which differentiate them from necrotic cell death, including: cytoplasm shrinkage, decrease of cell volume, pH acidification, DNA fragmentation into high molecular weight fragments (50-300 kbp), internucleosomal DNA fragmentation (180-200 bp), chromatin condensation and formation of apoptotic bodies [3]. Apoptosis can be induced by various initiators such as mitochondrial perturbing agents in the like of toxic compounds or chemotherapeutic agents [4,5]. Mitochondrial alterations are associated with the loss of the inner membrane electrochemical gradient, cytochrome c and apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1) release, resulting in the formation of a multi-protein complex, the apoptosome, activating caspase-9 and downstream activation of caspase-3 [6].

Activated-caspase-3 translocates to the nucleus and mediates nuclear alterations by activation of the DNA fragmentation factor 40 (DFF40), also called caspase-activated DNase (CAD), which is the primary nuclease responsible for oligonucleosomal DNA fragmentation during apoptosis [7,8]. In proliferating cells, DFF40 exist as an inactive complex with is 45 kDa inhibitor, the DNA fragmentation factor 45 (DFF45), also called inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD). It has been reported that during its latent

state, DFF40 forms a heterodimeric structure with DFF45 of about 100 kDa [9-11] and also a heterotetramer or dimer of heterodimers structure of around 180 kDa [12]. After DFF45 cleavage by caspase-3 or -7 [13,14], DFF40 becomes an active nuclease and there is a formation of high molecular weight homo-oligomers [11,14,15]. DFF45 is a molecular chaperone involved in folding of DFF40 and acts as an inhibitor of DFF40 nuclease activity, resulting in the formation of the DFF complex. A 35 kDa splicing variant of DFF45 (DFF35/ICAD-S) also exists, lacking the C-terminal domain, which can serve as an inhibitor but not as a chaperone [10,16,17]. DFF complex is localized in the nucleus [18-20] although it was first isolated from cytoplasmic extracts [9,10] as a result from leakage of nuclear proteins during fractionation. Both DFF40 and DFF45 have their own nuclear localization signal (NLS) located on their C-terminal end and both NLS enhance nuclear localization [21].

Despite the fact that DFF45 is known to inhibit DFF40 nuclease activity, other proteins have been identified to be involved in DFF40 regulation. The molecular chaperones HSC70 and HSP40 assist in the assembly of the DFF heterodimer during translation [22]. DFF40 DNase activity is enhanced by chromatin proteins that stimulate DNA cleavage: histone H1, HMGB1/2 and topoisomerase II [14,18,23]. The complexes nucleophosmin (B23)/PI3P and Ebp1/Akt inhibit the nuclease due to their binding capacity to activated DFF40 [24,25]. The CIIA protein inhibits the nuclease by binding to the DFF heterodimer [26]. The DFF40 nuclease activity can also be inhibited by poly-anions such as heparin, polyglutamic acid, poly(ADP-ribose) and nucleic acids (single stranded DNA, RNA and DNA-RNA heteroduplexes) [27,28]. It was recently shown that the

phosphorylation of histone H2A.X is necessary for DNA fragmentation by DFF40 [29]. Endonuclease activity of DFF40 also requires cofactors such as Cl⁻ efflux, intracellular Ca²⁺ elevation and neutral pH [30]. Despite the fact that cells can die by apoptosis without having a DNA fragmentation, nuclear apoptosis is important as it has been suggested that oligonucleosomal DNA fragmentation reduces the risk of transferring genetic information from apoptotic cancer cells to neighboring cells [31]. It also has been suggested that it minimizes the production of auto-antibodies against heterochromatin associated with auto-immune diseases [32]. The mechanisms of regulation by DFF are not fully understood and need to be further studied to complete our knowledge.

We previously reported the absence of nuclear apoptosis in T cells deficient for CD45 expression [33,34]. Contrary to CD45-positive cell lines, CD45-negative cell lines are resistant to nuclear apoptosis when exposed to mitochondrial perturbing agents. While apoptotic machinery seems to be activated in CD45-negative cell lines, neither chromatin condensation or DNA fragmentation are observed following exposure to mitochondrial perturbing agents. CD45 is a transmembrane tyrosine phosphatase expressed in all nucleated cells of haematopoietic origin [35]. Phosphorylation and dephosphorylation are mechanisms of apoptosis regulation that are being increasingly investigated. In T cell activation, CD45 has an important role in the phosphorylation state and activation of numerous proteins. The main role of CD45 is to regulate the signaling thresholds of receptors expressed in immune cells. Indeed, this phosphatase has been shown to be an essential regulator of T- and B- cell antigen receptor signalling [36]. In T cells, deficiency of CD45 expression causes T cell receptor (TCR) to be uncoupled from signalling

pathways, and therefore the cells are refractory to an antigenic stimulation [37]. Multiple isoforms of CD45 exist as a result of the alternative mRNA splicing of the exons 4, 5 and 6 coding for the various extracellular N-terminal peptide segments (designated A, B and C) [38]. Naïve T cells express the larger CD45RA isoform while activated memory and transformed T cells carry the smaller CD45RO isoform. In T cells, CD45 plays a positive regulation of TCR by dephosphorylating negative regulatory tyrosine residues of p56lck and p59fyn, two members of the Src family, increasing their kinase activity and activation of the cell [37]. CD45 can also be a negative regulator by dephosphorylating tyrosines residues on TCR zeta chain [39]. CD45 is also known to be a Janus kinase (Jak) phosphatase that negatively regulates the cytokine receptor signaling [40] which results in a reduction of the activity of Jak involved in the differentiation, proliferation and antiviral immunity of haematopoietic cells [41]. An unexpected role of CD45 in the regulation of apoptosis emerged recently. Triggering CD45 with monoclonal antibodies can induce or increase apoptosis in thymocytes, T cells, B cells and eosinophiles [42-45]. Interestingly, the absence of DNA fragmentation was also noted with CD45 crosslinking-mediated apoptosis [42,43].

We previously showed the necessity of CD45 expression in nuclear apoptosis induced by mitochondrial-perturbing agents such as tributyltin (TBT) [33,34]. We showed that the lack of nuclear apoptosis is associated with a perturbation of ionic homeostasis in CD45-deficient cells related to an inhibition of the chloride channel phosphorylation, known to be regulated by members of the Src family [33]. In both CD45-positive and CD45-negative T cell lines, other hallmarks of apoptosis are detectable, including intracellular

calcium mobilization, mitochondrial membrane potential dissipation, cytochrome c releases from mitochondria, caspase-3 activation and DFF45 cleavage. Interestingly, subcellular fractionation reveals a decrease in nuclear localization of caspase-3 and DFF40 in the absence of CD45 expression [33]. Studies in cell-free systems revealed that the defective signal responsible for the lack of nuclear apoptosis in CD45-negative cell lines was located in the cytoplasm downstream of caspase-3 activation. Lack of nuclear apoptosis was also observed by H₂O₂ exposition, but the involvement of CD45 in nuclear apoptosis is dependent on the induced pathway as cycloheximide leads to DNA fragmentation in CD45-deficient cells. Moreover, DNA fragmentation was also induced by TBT in cells deficient for the expression of p56lck, ZAP-70 and SHP-1, excluding the possible implication of the CD45 substrates p56lck, ZAP-70 and another tyrosine phosphatase SHP-1 [34]. Hence, the aim of this study was to determine the role of CD45 expression in nuclear apoptosis during chemically-induced apoptosis, through the characterization of molecular factors implicated in nuclear apoptosis, mainly the DFF complex.

Materials and methods

Cell culture

HPB-ALL (Pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia cell line) 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 (Sigma-Aldrich) culture medium supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 50 µM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Cells were maintained at 37°C under 5 % CO₂.

Transfection

The cDNA encoding the human DFF40 (hCAD) was kindly provided by Dr Gergely L. Lukacs (Hospital for Sick Children Research Institute, University of Toronto, Canada) and the cDNA encoding the human DFF45 was obtained from Origene (Maryland, USA). To generate HPB-ALL and HPB45.0 stably overexpressing DFF40, cells were transfected with the pcDNA3-hCAD expression vector using LipofectamineTM cationic lipid reagent according to the manufacturer's instructions, and selected in the presence of 1.5 mg/ml G418 (Sigma-Aldrich). After generating stable cell lines, DFF45 encoded in the plasmid pCMV-AC was co-transfected using LipofectamineTM and after 48 hours of incubation cells were collected and analyzed by immunofluorescence.

Cell treatments

Cells were washed twice in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and seeded in 24-well microplates at 1×10^6 cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 0.1% FBS. The TBT (Tributyltin chloride 97 % purity, Sigma, Wisconsin, USA) stock solution (50 mM) was prepared in ethanol with final concentrations not exceeding 0.1% in the culture media. The cells were exposed to 0.8 μ M of TBT for 4 hours at 37°C, collected, and washed twice with PBS before being used.

Immunostaining

After TBT exposure, transfected HPB-ALL and HPB45.0 were washed in PBS, fixed in PBS containing 4% formaldehyde (Fisher Scientific) for 15 min, washed three times with PBS and deposited on a glass slide by cytospin centrifugation with a Cyto-Tek Centrifuge. Cells were permeabilized in PBS containing 0.25% Triton X-100 (Biopharm inc., Quebec, Canada) for 10 min, blocked in 1% bovine serum albumin (Fisher Scientific) and incubated with the rabbit anti-DFF40 (Prosci Incorporated, California, USA) antibody (1:20). Primary antibody was visualized with FITC-conjugated goat anti-rabbit (Sigma-Aldrich) antibody (1:50) and cells nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Fluorescence was visualized using a Leica EC3 microscope.

Blue Native PAGE (BN-PAGE)

Treated cells (2.5×10^5) were washed twice in ice-cold PBS and resuspended in 10 μ l of lysis buffer 2X (2% NP-40, 40 mM Tris-HCl pH 7.4). Lysates were treated with 20 μ g/ml DNase I (Invitrogen) for 1h at 37°C. Thereafter, 10 μ l of BN-PAGE buffer 2X (1M e-amino caproic acid, (Sigma-Aldrich), 4 mM EDTA, 20% glycerol) and 5 μ l of BN-PAGE sample buffer (100 mM Bistris, 500 mM e-amino caproic acid, 5% Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma-Aldrich)) were added. Solubilized proteins were subjected to a BN-PAGE using a 4-16% gradient gel. Migration was done at 80 V for 5 hours at 4°C with BN-PAGE cathode buffer (50 mM Tricine (Sigma-Aldrich), 15 mM Bistris, 0.02% Coomassie Brilliant Blue G250) and BN-PAGE anode buffer (50 mM Bistris, pH 7.0). After two third of the migration the BN-PAGE cathode buffer was replaced with BN-PAGE cathode buffer without Coomassie Blue. GE Healthcare HMW-Native protein markers were used as the molecular weight standards. Proteins from the gel were transferred onto a PVDF membrane with transfer buffer containing 0.1% SDS. The membrane was unstained with 40% methanol (Fisher Scientific) and 10% acetic acid (Fisher Scientific) and then analyzed by Western blotting.

Non denaturing PAGE

TBT-treated cells (1.5×10^6) were washed twice in ice-cold PBS and resuspended in 20 μ l of non denaturing sample buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.01% bromophenol blue, 10% glycérol, 0.1% NP-40). Cell lystates were loaded on a 5% non-denaturing

acrylamide gel and migration was done at 50 V for 7 hours. The gel was then soaked in transfer buffer containing 0.1% SDS, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane and immunoblotted with the appropriate antibody.

Immunoprecipitation

Immunoblot was performed with 15×10^6 cells of both cell lines. After harvesting, cells were resuspended in lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02 % sodium azide, 1 % NP-40, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml pepstatin A, 1 mM PMSF and 200 μ M sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich)) and incubated 30 min at 4°C with intermittent vortexing. Cell lysates were centrifuged and supernatants were incubated with anti-DFF45 antibody (Prosci incorporated, California, USA) overnight at 4°C with gentle agitation. Protein A/G-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA) was added and incubated for 3 hours at 4°C with gentle agitation. The beads were pelleted by centrifugation, washed three times in lysis buffer and immune complexes dissociated in loading buffer heated at 100°C for 10 min. The proteins were then subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis.

Western blotting

Proteins from equal amounts of whole cell lysates (1×10^6 cells/lane) or from immunoprecipitations were loaded on a 5%, 7.5 % or 10 % SDS-polyacrylamide gel, separated and transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, California, USA).

Membranes were blocked one hour at room temperature with 5% skim milk or 2% bovine serum albumin. Membranes were then probed with the desired antibodies: anti-PARP-1 (Biosource International inc., California, USA), anti-NuMa, anti-Tpr, anti-NUP153 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA), anti-DFF40 raised against residues 203-218 (Prosci incorporated, California, USA), anti-DFF40 raised against residues 3-18 (eBioscience, San Diego, USA), anti-DFF40 raised against residues 329-338 (Calbiochem, California, USA), anti-DFF45 (Prosci incorporated, California, USA), anti-phosphotyrosine (4G10) (Upstate Biotechnology, New York, USA), anti-acetylated lysine (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) or anti-actin (Sigma-Aldrich). Detection was done using a horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA) or a horseradish peroxidase-labeled anti-mouse (GE Healthcare) antibody and visualization of the bands was done by chemiluminescence with the Ecl+ system (Amersham Biosciences).

Results

Inhibition of nuclear apoptosis in HPB45.0 cells is not related to the lack of PARP-1 or NuMa cleavage.

We have previously shown the absence of DNA fragmentation after induction of apoptosis by mitochondrial perturbing agents in cells that had lost CD45 expression [33,34]. Moreover, we showed a decrease in nuclear lamin B cleavage in CD45-deficient cells while XIAP cleavage, a cytoplasmic caspase-3 substrate, remained normal. To better understand this disparity, we investigated if other nuclear proteins are cleaved after the induction of apoptosis. Firstly, we verified the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1), a nuclear protein involved in the DNA-base-excision-repair system and a caspase-3,-7 substrates [46-48]. It has been reported that expression of a caspase-3-resistant PARP-1 mutant inhibited DNA fragmentation and that non-cleaved PARP-1 can inhibit DFF40 activity [49,50]. As shown in Figure 1A, PARP-1 is cleaved in CD45-positive (HPB-ALL) and in CD45-negative (HPB45.0) cell lines. Secondly, the cleavage of nuclear matrix protein, NuMa which is involved in mitotic centrosome function was determined [51]. A NuMa mutant resistant to degradation, protected cells from nuclear disruption and attenuated DNA fragmentation upon apoptosis [52]. Western blot analysis showed a complete NuMa cleavage in both cell lines after apoptosis induction by TBT exposition (Fig. 1B). Thus, PARP-1 and NuMa cleavages are not impaired by the absence of CD45 expression in TBT-induced apoptosis and can not be responsible for the lack of DNA fragmentation in CD45-deficient cells.

Nuclear pores are selectively cleaved in CD45- cell lines treated with TBT.

During apoptosis the nuclear pore complex is dismantled and the nuclear-cytoplasmic barrier is disrupted allowing molecules such as caspases and nucleases to reach the nucleus [53,54]. The temporal correlation remains unclear, but a model has been suggested in which the initiator caspase-9 directly or indirectly disassembles the nuclear-cytoplasmic barrier and increases the diffusion limit of the nuclear pores. This increase in the diffusion limit allows caspase-3 and other molecules that could not pass through the nuclear pores to enter or leave the nucleus during apoptosis [55]. Our previous work showed that after apoptosis induction, caspase-3 is located in the nucleus in CD45-positive cell lines while it stays mainly localized in the cytoplasm in CD45-negative cells [34]. Later results combined to a significantly less cleavage of lamin B in CD45-negative cells led us to determine if nuclear pore complex proteins are cleaved to the same extent in CD45+ and CD45- cell lines. We evaluated the cleavage of two nucleoporins located at the nuclear side of the nuclear pore complex, Tpr and NUP153. After apoptosis induction by TBT treatment, nuclear pore component Tpr is cleaved to the same extent in both cell lines (Fig. 1C). However, the proteolysis of NUP153 is partial in cells deficient in CD45 expression (Fig. 1D). These results suggest that there is a defect in the dismantling of the nuclear pore complex in CD45- cells. Interestingly, it was reported that the disappearance of NUP153 and lamin B coincides with the onset of DNA fragmentation and clustering of nuclear pores [53].

Immunostaining confirms that DFF40 is mainly localized to the cytoplasm in cells that lost CD45 expression.

Even though DFF complex was initially found in the cytoplasm [9,10], it is well established that the complex actually resides in the nucleus of normal healthy cells [18-20,56]. Identification of DFF in the cytoplasmic fraction can be explained by the fact that DFF is part of a group of proteins that can easily be found in the cytoplasm during subcellular fractionation [11]. As we previously used subcellular fractionation to localize DFF40 in the cytoplasmic fraction of CD45⁻ cells [34], we wanted to verify if DFF40 was really present in the cytoplasm or if it was due to a leakage from the nuclear fraction during isolation of subcellular fractions. For this purpose, we determined the cellular localization of DFF40 in CD45⁺ and CD45⁻ cell lines overexpressing DFF (Stable cell lines from multiple clones.). Overexpression of DFF was essential since basal expression is too low to be detected by immunostaining. As expected, in control CD45⁺ cell lines, DFF40 was mainly localized in the nucleus (Fig. 2). After 4 hours of TBT-induced apoptosis, DFF40 was still in the nucleus in CD45⁺ cells. Because these cells started to disintegrate, more fluorescence was present in the cytoplasm as a result of the shrinkage of the nucleus. In contrast, DFF40 was localized mainly in the cytoplasm of CD45⁻ cell lines in the control treatments or after 4 hours of TBT exposition. These results indicated and confirmed the impairment of DFF40 to migrate in the nucleus in CD45-negative cell lines upon apoptotic conditions.

Different DFF40 oligomers formation depending on the CD45 expression.

It was established that homo- and heteromeric protein–protein interactions play a role in the regulation of DFF40 activity. Particularly, DFF40 oligomerization may represent an important condition in apoptotic cells [14]. Thus, we wondered if DFF40 still forms oligomers after apoptosis induction in cells that lost the CD45 expression. First, we used a non-denaturing gel and Western blot analysis to determine the homo- and heteromeric protein-protein interactions for DFF40 in both cells lines (Fig. 3A). There was a distribution of DFF40 from 85 to up 180 kDa in CD45+ vehicle treated cells. On the other hand, only an intense band with a high molecular weight was detected in CD45- cells. DFF40 bands in CD45+ disappeared following TBT-induced apoptosis. In CD45- cells, high molecular bands remained unchanged. Although this method could not determine the molecular weight of DFF40 oligomers after apoptosis induction, it showed that DFF40 oligomers in CD45- cells were smaller than in CD45+ cells as no oligomer could enter in the gel in CD45+ cells treated with TBT (Fig. 3A). To determine the molecular mass of DFF40 homo- or hetero-oligomers, we used the BN-PAGE technique, which allows the separation of protein complexes of high molecular weight under native conditions. In steady state, both CD45+ and CD45- cells expressed multiple oligomers of DFF40 with different molecular weights (Fig. 3B). While DFF40 formed oligomers of around 85, 125, 200, 300 and over 400 kDa in CD45+ cells, DFF40 oligomers of 85 and 125 kDa were absent in CD45- cells. Major oligomers of around 200-300 kDa were predominantly present in cells lacking CD45 expression. Together, these results demonstrated that DFF40 forms oligomers of high molecular weights in non-apoptotic

cells and that the oligomerization pattern changes after apoptosis induction in CD45+ cells. In CD45- cells, low molecular weight of oligomers were absent in non-apoptotic cells. Apoptosis induction resulted in a change of oligomers pattern suggesting the formation of supramolecular complex with a molecular mass over 500 kDa.

Antibodies epitope mapping of DFF40 changes between CD45+ and CD45- cell lines.

The absence of DNA fragmentation and modification in oligomers formation prompted us to analyze denatured DFF40 in CD45+ and CD45- cell lines. We first used a polyclonal antibody specific to full length of DFF40 to determine the expression level in both cell lines before or after induction of apoptosis (Fig. 4A). DFF40 was expressed to the same level in CD45-positive and CD45-negative cell lines and no changes occurred after TBT exposition. We then used an antibody raised against amino acids 203-218 corresponding to an internal portion of DFF40 (Fig. 4B, middle panel). Interestingly, the DFF40 pattern was completely different between CD45+ and CD45- cells, before or after apoptosis induction. Only one band corresponding to DFF40 was detected in non-apoptotic CD45+ cells. However, after 4 hours of TBT-induced apoptosis, a second band with lower molecular weight was detected by the DFF40 antibody. In CD45- cells, two bands corresponding to DFF40 were identified in resting cells, and TBT-induced apoptosis led to an increase of a lower weight band associated with the loss of the higher molecular form. Moreover, the higher molecular band in resting CD45- cells was higher than the band in resting CD45+ cells. Next, we used an antibody specific to the N-terminal portion of DFF40 (a.a. 3-18) or an antibody recognizing the C-terminal region of

DFF40 (a.a. 329-338). We compared the recognition patterns of these DFF40 antibodies (N-terminal, internal and C-terminal) following protein separation from cells lysates of none or apoptotic cells. To increase the accuracy of comparison, each protein samples were separated onto the same gel. The results indicated that DFF40 bands recognized by the N-terminal antibody corresponded to the high molecular form (Fig. 4B, left panel) with the anti-DFF40 antibody raised against the internal portion. The bands recognized by the C-terminal antibody corresponded to the lower band identified with internal antibody (Fig. 4B, right panel).

Our results suggest that DFF40 seems to be modified in its N-terminal end since it corresponded to the high molecular form of the DFF40 detected with the antibody recognizing the internal portion. Furthermore, the intensity of the N-terminal bands decreases in the same way than DFF40 modifications identified by the anti-DFF40 antibody detecting the internal portion and no bands is detected underneath corresponding to the small fragments of DFF40. Surprisingly, the C-terminal antibody only recognized the fragment of DFF40 before modifications. The high molecular form of DFF40 was not detected. While post-translational modifications of DFF40 has not been yet studied, post-translational modifications could explain the absence of recognition by specific anti-DFF40 antibodies. Together our results showed that DFF40 was expressed into distinct forms in both cell lines.

Identification of post-translational modifications in both DFF45 and DFF40 that can differ according to the CD45 expression.

Although post-translational modifications of DFF40 have not been demonstrated, it has been suggested that it could be involved in its activation [57]. In our system, post-translational modifications can explain the change in oligomeric form of DFF40 and the lack of DNA fragmentation in CD45⁻ cells. To explore a possible post-translational modification, we co-immunoprecipitated DFF40 with anti-DFF45 in resting CD45⁺ and CD45⁻ cells. As expected, immunoprecipitation showed that DFF40 co-immunoprecipitates with DFF45 (Fig. 5A). Localization of nuclear proteins can be influenced by post-translational modifications. For instance, nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation and acetylation [58,59]. No evidence of acetylation or phosphorylation of DFF complex has previously been found. To determine if a posttranslational modification can be correlated with DFF cellular localization, the membrane was stripped and rehybridized with either anti-acetylated lysine or anti-phosphotyrosine, or anti-phosphoserine/threonine. Surprisingly, using anti-acetylated lysine, we found two specific bands located at the same position of DFF45 and DFF35 when membranes were merged in both cell lines (Fig. 5A). As for DFF40, we found a band corresponding to acetylated lysyl residues only in CD45⁻ cells (Fig. 5A). Using an anti-phosphotyrosine antibody, we showed that DFF45 from CD45⁺ cells had phosphorylated tyrosine residues (Fig. 5B). Later post-translational modifications were not found in CD45⁻ cells. No such modifications were present in DFF complex using a panel of phospho-serine/threonine. These results demonstrate for the first time post-

translational modifications of DFF complex and that a relation exists between CD45 expression, DFF40 acetylation and DFF45 phosphorylation on tyrosine residues.

Discussion

Our results indicated a role of CD45 in DFF40 regulation involved in nuclear apoptosis in T cells. In contrast to wild type cells, CD45-deficient cells are resistant to nuclear apoptosis induced by mitochondrial perturbing agents. We showed that nuclear pores dismantling during apoptosis is partially impaired in cells that lost the CD45 expression. By analyzing directly the nuclease responsible of DNA fragmentation we demonstrated that DFF40 is mainly localized to the cytoplasm in CD45-negative cells. Associated with later change, DFF40 oligomerization state changes depending on the expression of CD45. Moreover, CD45 expression was associated with different molecular forms of this endonuclease and their post-translational modifications.

CD45 has been described as the major tyrosine phosphatase of lymphocytes accounting for more than 90% of the total phosphatase activity in T and B cells [60]. CD45 is an essential regulator of signal transduction pathways in immune cells [36,38,61]. The main role of CD45 is to regulate the signaling thresholds of receptors expressed on immune cells since. Considering that phosphorylation and dephosphorylation are involved in apoptosis regulation, it is not surprising that CD45 can play a role in the phosphorylation state of numerous proteins involved in apoptosis regulation. Although some studies have demonstrated an implication of CD45 in apoptosis regulation [62],[42-45,63] little is known about the mechanisms and the pathways involved in this process. It was shown that CD45+ myeloma cell lines were more sensitive to various apoptotic stimuli compared to CD45- cells [63]. Increased susceptibility to apoptosis in CD45+ myeloma cells is accompanied by the increased expression of VDAC1 [63]. The triggering of

apoptosis by CD45 in immune cells has been reported in many studies [42-45]. It was reported that this apoptosis induction is characterized by a reduction in mitochondrial membrane potential, production of reactive oxygen species, loss in membrane asymmetry, exposure of phosphatidylserine residues, and incorporation of vital dyes. Interestingly, CD45 cross-linking did not lead to DNA degradation [42,43]. The absence of DNA fragmentation could be explained by an inhibition of CD45 phosphatase activity, as CD45 binding induces its dimerization and this interaction results in the blocking of the catalytic site, thus inhibiting the phosphatase activity [64-67]. CD45 expression also influences the apoptosis induced by HIV-1. Indeed, a significant reduction of gp120-induced apoptosis in CD45- cell lines was recently demonstrated [62]. CD45 could modulate gp120-apoptosis by regulating Fas ligand induction and via the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway [62].

We have previously shown that transfection of CD45 cDNA into CD45-negative cells restores DNA fragmentation to the same level of the wild type cells after exposure to apoptotic stimuli [34]. Although caspase-3 was active, it was found mainly in the cytoplasm of CD45- cells, and the cleavage of caspase substrates were not the same [34]. In the present work, we showed that the dismantling of the nuclear pore complex was not fully completed in absence of CD45 expression. Temporal and mechanistic regulation of nuclear pores dismantling is not fully understood, but both Tpr and NUP153 are known to be cleaved by caspase-3 [68]. It was demonstrated that the phosphorylation state of various proteins influences their cleavage by protease [69-71]. Phosphorylation state of NUP153, which are shown phosphorylated by an unknown kinase [72], can explain the

lack of NUP153 cleavage in CD45⁻ cells. Moreover, Porter and Palmenberg [73] reported that a hyperphosphorylation state of nucleoporins NUP62, NUP153 and NUP214, inhibits nuclear import/export activity. Therefore, nuclear transport in CD45⁻ cells could have been impaired due to a hyperphosphorylation state of some nuclear pore components. Such evidence can explain the DFF40 localization in the cytoplasm in CD45⁻ cells, and suggests that nuclear transport in these cells could be impaired. On the other hand, phosphorylation of a molecule near a NLS is known to inactivate NLS and inhibit nuclear import of molecules [74,75]. It has also been reported that acetylation is required for nuclear retention of molecules [76,77]. These two post-translational modifications do not seem responsible for DFF40 cytoplasmic localization in CD45⁻ cells as we did not identify any phosphorylation of the DFF complex in the CD45⁻ cells and the DFF40 was only acetylated in CD45⁻ cells. Interestingly, the different patterns of DFF40 oligomers in CD45⁻ cells may account for its nuclear localization. Indeed, interactions with importins/exportins can be inhibited by masking targeting signals during molecule oligomerisation [78].

We demonstrated for the first time DFF40 oligomers formation using the BN-PAGE technique. Moreover, we demonstrated the formation of high molecular weight DFF oligomers in normal proliferating cells (CD45⁺). The highest DFF oligomer molecular weight that has been reported is a heterotetramer or dimer of heterodimers structure of around 180 kDa [12]. In our model, high molecular weight DFF40 oligomers are inactive as no DNA fragmentation is obviously occurring in non-apoptotic CD45⁺ cells [34]. DFF40 oligomers of molecular weight around 200, 300 and over 400 kDa in normal non-

apoptotic CD45⁺ cells do not form higher DFF40 homo-oligomers after apoptosis induction as they are still detectable. Nevertheless, DFF40 oligomers of around 125 kDa disappeared after apoptosis induction, suggesting DFF40 homo-oligomers formation of higher molecular weight. Similarly, DFF40 oligomers of 200-300 kDa in control CD45⁻ cells decreased after apoptosis induction, also suggesting formation of higher molecular weight homo-oligomers. As the BN-PAGE technique has never been used before to detect DFF40 oligomerization, it could explain why no high molecular weight DFF40 oligomers have been reported before in normal non-apoptotic cells, or it could be also specific to these cell lines.

Using the epitope mapping approach we showed that DFF40 is expressed into distinct forms in both CD45⁺ and CD45⁻ cells. Interestingly, the reactivity of antibodies specific to the N-terminal or C-terminal portions of DFF40 was markedly influenced by CD45 expression, specifically in apoptotic cells. We suggest that these distinct forms can be due to different post-translational modifications. DFF40 in both CD45⁺ and CD45⁻ cells seems to be prone to modifications after apoptosis induction as other DFF40 molecular weight species appear underneath. It is possible that DFF40 is post-translationally modified and it loses some of these modifications at the later stages of apoptosis, after a nuclear breakdown to protect neighboring cells against possible damage from the release of functional nuclease. In non-apoptotic CD45⁻ cells, DFF40 seemed to have already lost some post-translational modifications as two distinct bands were detected. As different DFF40 bands were detected in CD45⁻ cells after apoptosis induction, DFF40 seemed to have lost more post-translational modifications than in CD45⁺ cells. The decrease of

DFF40 post-translational modifications in CD45⁻ cells can be regulated by the CD45 molecule or through their substrates or signaling pathway. This decrease of DFF40 post-translational modifications in CD45⁻ cells could also be a consequence of DFF40 cytoplasmic localization or its different pattern of oligomerization that could lead the DFF40 more or less accessible to one or more regulators.

Post-translational modifications of DFF has never been addressed previously. Here we showed that DFF45 and DFF35 are acetylated in both CD45⁺ and CD45⁻ cells. Acetylation is a post-translational modification that is mainly known as an activator of gene transcription by acetylation of histones or transcription factors such as p53 [16,79]. Both phosphorylation and acetylation have been reported to be required or to regulate oligomerization of proteins [80,81]. We showed that DFF40 is acetylated only in CD45⁻ cells and that this acetylation is likely to be the reason for a higher molecular weight. We were not able to identify any phosphorylation on either CD45⁺ or CD45⁻ cells with a panel of antibodies specific to phosphorylated Ser/Thr or Tyr in non-apoptotic cells by co-immunoprecipitation of DFF40 with DFF45 antibody. Other approaches need to be developed as phosphorylation of DFF40 can represent a post-translational mechanism of regulation for their localization and activity during apoptosis. Several other post-translational modifications can be present on DFF40. Among them, glycosylation, sumoylation and palmitoylation are known to be associated with the regulation of functional activity, nuclear localization or oligomerization [82-84] and need to be explored.

Overall our work established the importance of the CD45 molecule in nuclear apoptosis. We provided some evidence for a post-translational mechanism for regulation of DFF40 activity. Post-translational control of endonuclease activity has been demonstrated for mammalian AP endonuclease where the functions are altered by phosphorylation, acetylation and ubiquitination [85]. Considering the consequences of accidental activation of DFF in cells, a post-translation modification of DFF subunit could directly influence their activity or interaction with regulatory proteins.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from NSERC: Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. We are grateful to Dr Gergely L. Lukacs for providing us with the plasmid pcDNA3-hCAD.

Figure Legends

Figure 1: PARP-1, NuMa and Tpr are cleaved in both CD45+ and CD45- cell lines while NUP153 cleavage is impaired in CD45- cell line. HPB-ALL (CD45+) and HPB45.0 (CD45-) were TBT-treated for 4 hrs with 0.8 μ M TBT or vehicle alone (EtOH: 0.1%). Whole cell protein extract (1×10^6 cells) were loaded on a 5% or a 7.5% SDS-PAGE and immunoblotted with A) anti-PARP-1 antibody, B) anti-NuMa antibody, C) anti-Tpr antibody or D) anti-NUP153 antibody. A), B), C) and D) These experiments are representative of three independent experiments.

Figure 2: DFF40 is cytoplasmic in CD45- cell lines following TBT exposure. Indirect immunostaining of HPB-ALL (CD45+) and HPB45.0 (CD45-) cells overexpressing DFF40. Cells were exposed to 0.8 μ M of TBT for 4 hrs or vehicle alone (V) (EtOH: 0.1%). The anti-DFF40 primary antibody was visualized with FITC-conjugated secondary antibody and the nuclear DNA was labeled with DAPI. These experiments are representative of three independent experiments.

Figure 3: DFF40 oligomers vary according to the CD45 expression. CD45-positive and CD45-negative cells were exposed to 0.8 μ M of TBT for 4 hrs or vehicle alone (EtOH: 0.1%). A) Whole cell protein extracts were separated on a 5% non-denaturing PAGE and immunoblotted with an anti-DFF40 antibody. B) Whole cell protein extracts were separated by Blue Native PAGE (4-16%) and immunoblotted with an anti-DFF40 antibody. A) and B) These experiments are representative of three independent experiments.

Figure 4: Variations of DFF40 in CD45+ and CD45- cell lines. HPB-ALL (CD45+) and HPB45.0 (CD45-) were TBT-treated for 4 hrs with 0.8 μ M TBT or vehicle alone (EtOH: 0.1%). Whole cell protein extract (1×10^6 cells) were loaded on a 10% SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-DFF40 antibody. A) Antibody raised against amino acids 1-338 representing full length of DFF40. B) Antibodies raised against residues 3-18, against residues 203-218, and against residues 329-338. A) and B) These experiments are representative of three independent experiments.

Figure 5: DFF45 is tyrosine phosphorylated in CD45+ cells, acetylated in both CD45+ and CD45- cell lines and DFF40 is acetylated in CD45- cells. Cells were lysed and DFF45 were immunoprecipitated using an anti-DFF45 antibody. Proteins were loaded on a 10% SDS-PAGE. A) Proteins were immunoblotted with an anti-DFF45 antibody, an anti-DFF40 antibody and an anti-acetylated lysine antibody. B) Proteins were immunoblotted with an anti-DFF45 antibody and an anti-phosphotyrosine antibody. A) and B) These experiments are representative of three independent experiments.

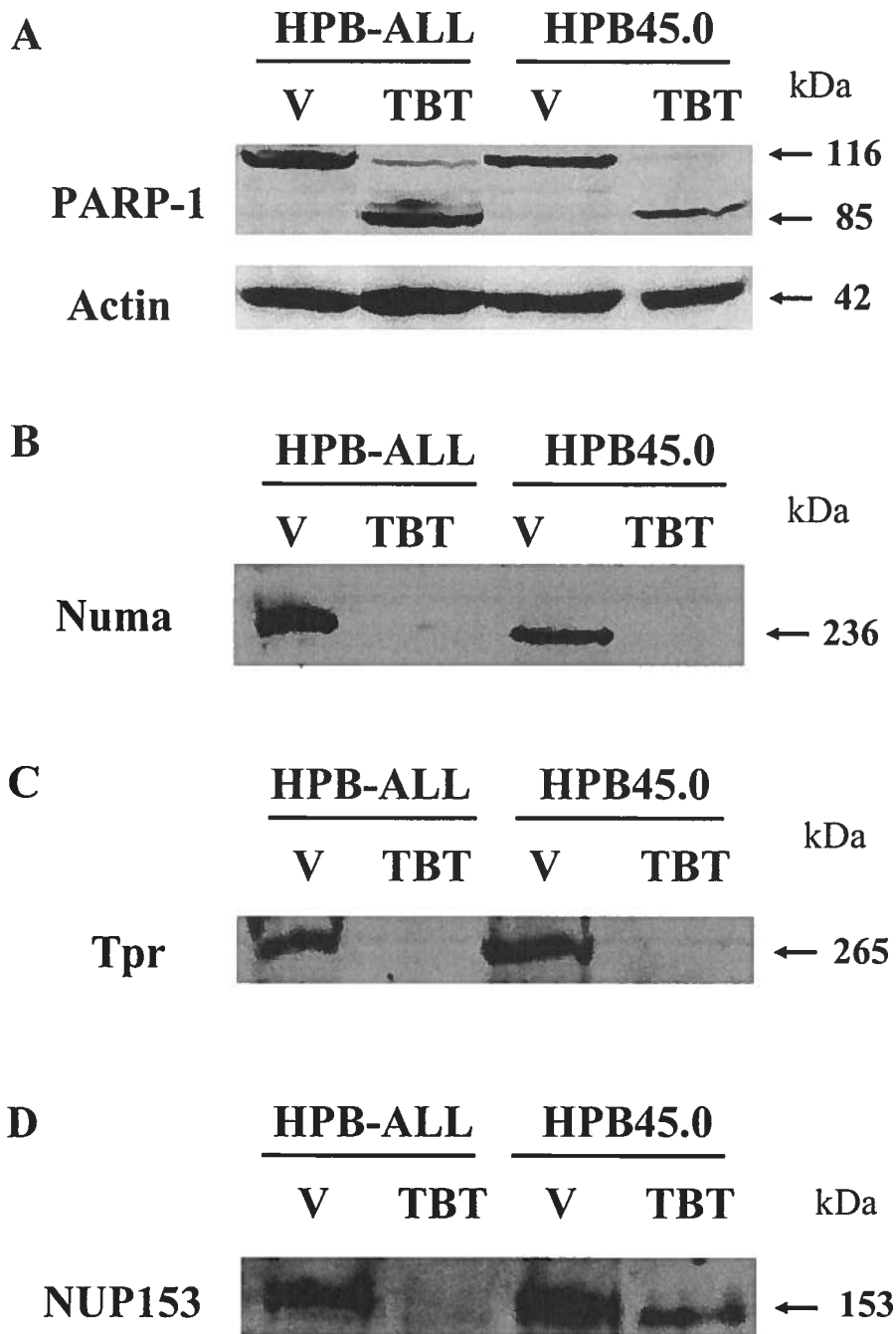


Figure 1

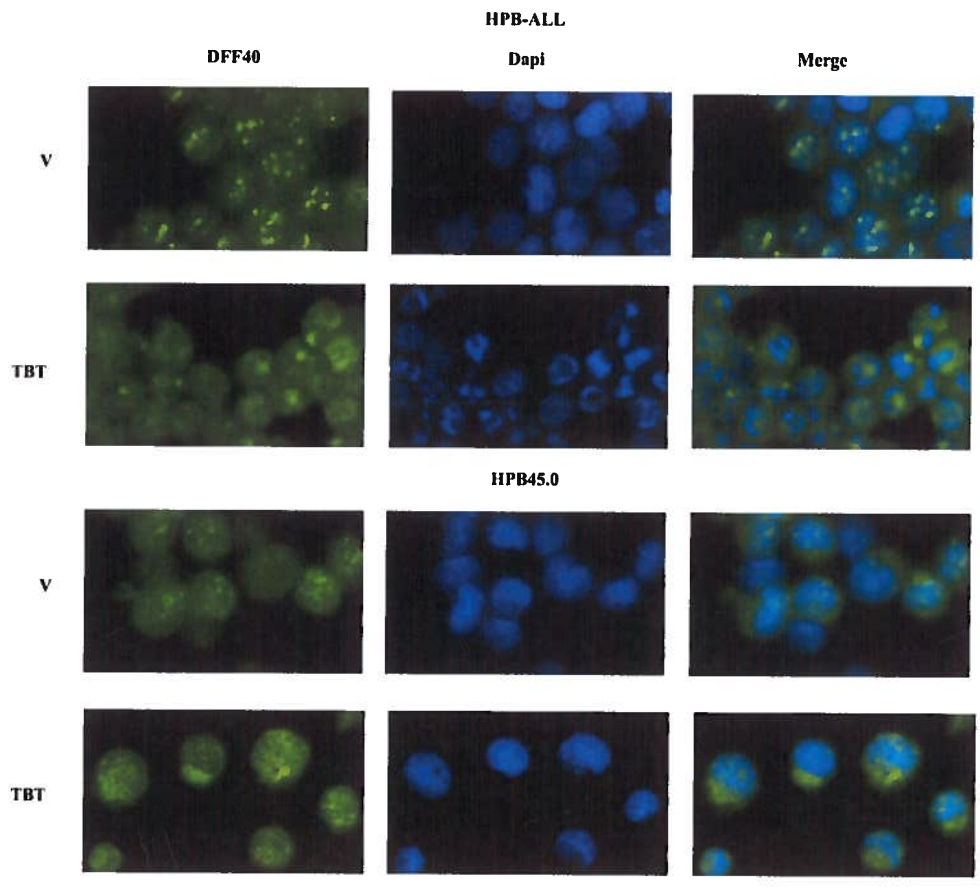
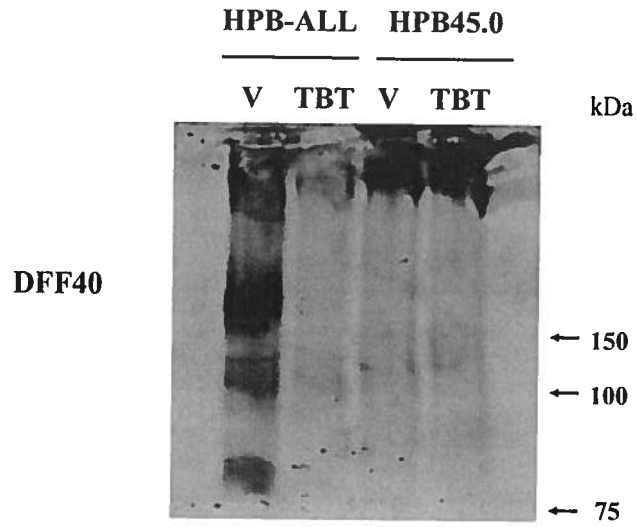


Figure 2

A



B

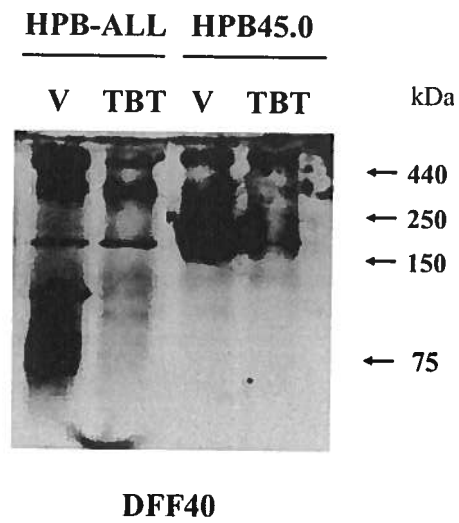
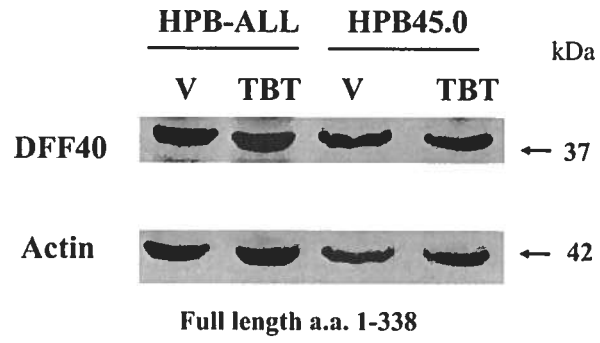


Figure 3

A



B

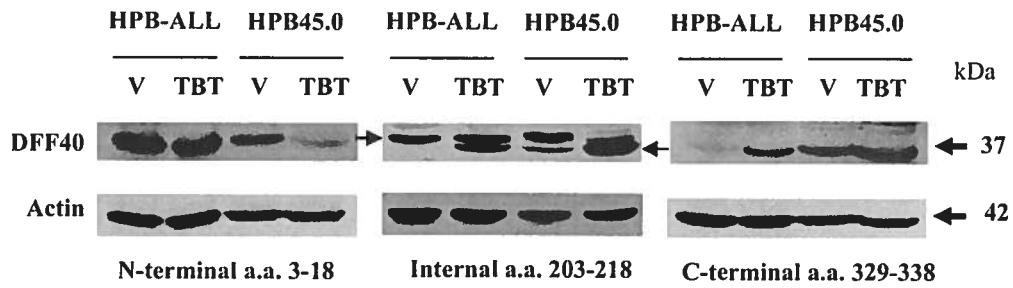
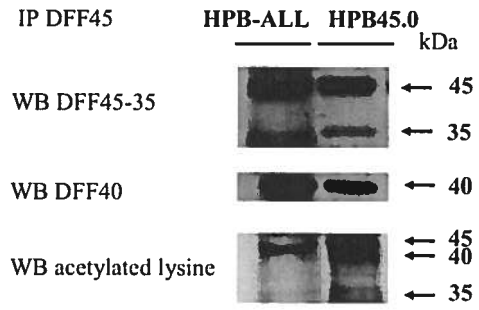


Figure 4

A



B

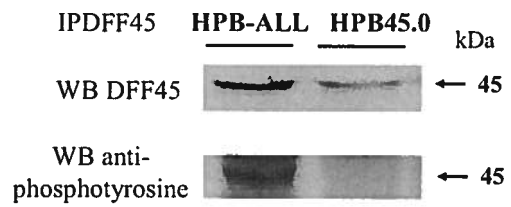


Figure 5

References

- [1] N. Joza, G. Kroemer, J. M. Penninger, Genetic analysis of the mammalian cell death machinery, *Trends Genet* 18 (2002) 142-9.
- [2] C. B. Thompson, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science* 267 (1995) 1456-62.
- [3] J. J. Cohen, Apoptosis: the physiologic pathway of cell death, *Hosp Pract (Off Ed)* 28 (1993) 35-43.
- [4] P. C. Kam, N. I. Ferch, Apoptosis: mechanisms and clinical implications, *Anaesthesia* 55 (2000) 1081-93.
- [5] M. Loeffler, G. Kroemer, The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita, *Exp Cell Res* 256 (2000) 19-26.
- [6] R. A. Gottlieb, Mitochondria: ignition chamber for apoptosis, *Mol Genet Metab* 68 (1999) 227-31.
- [7] S. Kamada, U. Kikkawa, Y. Tsujimoto, T. Hunter, Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein(s), *J Biol Chem* 280 (2005) 857-60.
- [8] P. Widlak, W. T. Garrard, Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G, *J Cell Biochem* 94 (2005) 1078-87.

- [9] X. Liu, H. Zou, C. Slaughter, X. Wang, DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis, *Cell* 89 (1997) 175-84.
- [10] M. Enari, H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, S. Nagata, A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature* 391 (1998) 43-50.
- [11] P. Widlak, J. Lanuszewska, R. B. Cary, W. T. Garrard, Subunit structures and stoichiometries of human DNA fragmentation factor proteins before and after induction of apoptosis, *J Biol Chem* 278 (2003) 26915-22.
- [12] D. Lechardeur, S. Dougaparsad, C. Nemes, G. L. Lukacs, Oligomerization state of the DNA fragmentation factor in normal and apoptotic cells, *J Biol Chem* 280 (2005) 40216-25.
- [13] H. Sakahira, M. Enari, S. Nagata, Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis, *Nature* 391 (1998) 96-9.
- [14] X. Liu, H. Zou, P. Widlak, W. Garrard, X. Wang, Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1, *J Biol Chem* 274 (1999) 13836-40.
- [15] E. J. Woo, Y. G. Kim, M. S. Kim, W. D. Han, S. Shin, H. Robinson, S. Y. Park, B. H. Oh, Structural mechanism for inactivation and activation of CAD/DFF40 in the apoptotic pathway, *Mol Cell* 14 (2004) 531-9.

- [16] Y. Tang, W. Zhao, Y. Chen, Y. Zhao, W. Gu, Acetylation is indispensable for p53 activation, *Cell* 133 (2008) 612-26.
- [17] A. V. Ageichik, K. Samejima, S. H. Kaufmann, W. C. Earnshaw. Genetic analysis of the short splice variant of the inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD-S) in chicken DT40 cells, *J Biol Chem* 282 (2007) 27374-82.
- [18] X. Liu, P. Li, P. Widlak, H. Zou, X. Luo, W. T. Garrard, X. Wang, The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 8461-6.
- [19] K. Samejima, W. C. Earnshaw, ICAD/DFF regulator of apoptotic nuclease is nuclear, *Exp Cell Res* 243 (1998) 453-9.
- [20] D. Lechardeur, L. Drzymala, M. Sharma, D. Zylka, R. Kinach, J. Pacia, C. Hicks, N. Usmani, J. M. Rommens, G. L. Lukacs, Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD), *J Cell Biol* 150 (2000) 321-34.
- [21] S. Neimanis, W. Albig, D. Doenecke, J. Kahle, Sequence elements in both subunits of the DNA fragmentation factor are essential for its nuclear transport, *J Biol Chem* 282 (2007) 35821-30.
- [22] H. Sakahira, S. Nagata, Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase, *J Biol Chem* 277 (2002) 3364-70.

- [23] P. Widlak, P. Li, X. Wang, W. T. Garrard, Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates, *J Biol Chem* 275 (2000) 8226-32.
- [24] J. Y. Ahn, X. Liu, D. Cheng, J. Peng, P. K. Chan, P. A. Wade, K. Ye, Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD, *Mol Cell* 18 (2005) 435-45.
- [25] J. Y. Ahn, X. Liu, Z. Liu, L. Pereira, D. Cheng, J. Peng, P. A. Wade, A. W. Hamburger, K. Ye, Nuclear Akt associates with PKC-phosphorylated Ebp1, preventing DNA fragmentation by inhibition of caspase-activated DNase, *EMBO J* 25 (2006) 2083-95.
- [26] S. G. Cho, J. W. Kim, Y. H. Lee, H. S. Hwang, M. S. Kim, K. Ryoo, M. J. Kim, K. T. Noh, E. K. Kim, J. H. Cho, K. W. Yoon, E. G. Cho, H. S. Park, S. W. Chi, M. J. Lee, S. S. Kang, H. Ichijo, E. J. Choi, Identification of a novel antiapoptotic protein that antagonizes ASK1 and CAD activities, *J Cell Biol* 163 (2003) 71-81.
- [27] P. Widlak, W. T. Garrard, Roles of the major apoptotic nuclease-DNA fragmentation factor-in biology and disease, *Cell Mol Life Sci* 66 (2009) 263-74.
- [28] J. Hanus, M. Kalinowska-Herok, P. Widlak, The major apoptotic endonuclease DFF40/CAD is a deoxyribose-specific and double-strand-specific enzyme, *Apoptosis* 13 (2008) 377-82.

- [29] C. Lu, F. Zhu, Y. Y. Cho, F. Tang, T. Zykova, W. Y. Ma, A. M. Bode, Z. Dong, Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3, *Mol Cell* 23 (2006) 121-32.
- [30] P. Widlak, W. T. Garrard, Ionic and cofactor requirements for the activity of the apoptotic endonuclease DFF40/CAD, *Mol Cell Biochem* 218 (2001) 125-30.
- [31] A. de la Taille, M. W. Chen, M. Burchardt, D. K. Chopin, R. Buttyan, Apoptotic conversion: evidence for exchange of genetic information between prostate cancer cells mediated by apoptosis, *Cancer Res* 59 (1999) 5461-3.
- [32] S. Nagata, Apoptotic DNA fragmentation, *Exp Cell Res* 256 (2000) 12-8.
- [33] G. Dupere-Minier, C. Hamelin, P. Desharnais, J. Bernier, Apoptotic volume decrease, pH acidification and chloride channel activation during apoptosis requires CD45 expression in HPB-ALL T cells, *Apoptosis* 9 (2004) 543-51.
- [34] P. Desharnais, G. Dupere-Minier, C. Hamelin, P. Devine, J. Bernier, Involvement of CD45 in DNA fragmentation in apoptosis induced by mitochondrial perturbing agents, *Apoptosis* 13 (2008) 197-212.
- [35] D. R. Alexander, The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function, *Semin Immunol* 12 (2000) 349-59.
- [36] J. G. Altin, E. K. Sloan, The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation, *Immunol Cell Biol* 75 (1997) 430-45.

- [37] C. M. Burns, K. Sakaguchi, E. Appella, J. D. Ashwell, CD45 regulation of tyrosine phosphorylation and enzyme activity of src family kinases, *J Biol Chem* 269 (1994) 13594-600.
- [38] I. S. Trowbridge, M. L. Thomas, CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development, *Annu Rev Immunol* 12 (1994) 85-116.
- [39] J. A. Frearson, D. R. Alexander, Protein tyrosine phosphatases in T-cell development, apoptosis and signalling, *Immunol Today* 17 (1996) 385-91.
- [40] J. Irie-Sasaki, T. Sasaki, W. Matsumoto, A. Opavsky, M. Cheng, G. Welstead, E. Griffiths, C. Krawczyk, C. D. Richardson, K. Aitken, N. Iscove, G. Koretzky, P. Johnson, P. Liu, D. M. Rothstein, J. M. Penninger, CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling, *Nature* 409 (2001) 349-54.
- [41] J. M. Penninger, J. Irie-Sasaki, T. Sasaki, A. J. Oliveira-dos-Santos, CD45: new jobs for an old acquaintance, *Nat Immunol* 2 (2001) 389-96.
- [42] S. Lesage, A. M. Steff, F. Philippoussis, M. Page, S. Trop, V. Mateo, P. Hugo, CD4⁺ CD8⁺ thymocytes are preferentially induced to die following CD45 cross-linking, through a novel apoptotic pathway, *J Immunol* 159 (1997) 4762-71.
- [43] S. J. Klaus, S. P. Sidorenko, E. A. Clark, CD45 ligation induces programmed cell death in T and B lymphocytes, *J Immunol* 156 (1996) 2743-53.

- [44] M. Ogimoto, T. Katagiri, K. Mashima, K. Hasegawa, K. Mizuno, H. Yakura, Negative regulation of apoptotic death in immature B cells by CD45, *Int Immunol*, 6 (1994) 647-54.
- [45] M. G. Blaylock, D. W. Sexton, G. M. Walsh, Ligation of CD45 and the isoforms CD45RA and CD45RB accelerates the rate of constitutive apoptosis in human eosinophils, *J Allergy Clin Immunol* 104 (1999) 1244-50.
- [46] S. J. Hong, T. M. Dawson, V. L. Dawson, Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling, *Trends Pharmacol Sci* 25 (2004) 259-64.
- [47] M. Tewari, L. T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D. R. Beidler, G. G. Poirier, G. S. Salvesen, V. M. Dixit, Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase, *Cell* 81 (1995) 801-9.
- [48] M. Germain, E. B. Affar, D. D'Amours, V. M. Dixit, G. S. Salvesen, G. G. Poirier, Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7, *J Biol Chem* 274 (1999) 28379-84.
- [49] A. H. Boulares, A. J. Zoltoski, F. J. Contreras, A. G. Yakovlev, K. Yoshihara, M. E. Smulson, Regulation of DNAS1L3 endonuclease activity by poly(ADP-ribosyl)ation during etoposide-induced apoptosis. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage in endonuclease activation, *J Biol Chem* 277 (2002) 372-8.

- [50] J. D. West, C. Ji, L. J. Marnett, Modulation of DNA fragmentation factor 40 nuclease activity by poly(ADP-ribose) polymerase-1, *J Biol Chem* 280 (2005) 15141-7.
- [51] A. D. Silk, A. J. Holland, D. W. Cleveland, Requirements for NuMA in maintenance and establishment of mammalian spindle poles, *J Cell Biol* 184 (2009) 677-90.
- [52] H. H. Lin, H. L. Hsu, N. H. Yeh, Apoptotic cleavage of NuMA at the C-terminal end is related to nuclear disruption and death amplification, *J Biomed Sci* 14 (2007) 681-94.
- [53] M. Kihlmark, G. Imreh, E. Hallberg, Sequential degradation of proteins from the nuclear envelope during apoptosis, *J Cell Sci* 114 (2001) 3643-53.
- [54] M. Kihlmark, C. Rustum, C. Eriksson, M. Beckman, K. Iverfeldt, E. Hallberg, Correlation between nucleocytoplasmic transport and caspase-3-dependent dismantling of nuclear pores during apoptosis, *Exp Cell Res* 293 (2004) 346-56.
- [55] L. Faleiro, Y. Lazebnik, Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier, *J Cell Biol* 151 (2000) 951-9.
- [56] K. Samejima, W. C. Earnshaw, 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* 255 (2000) 314-20.
- [57] P. Widlak, The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis, *Acta Biochim Pol*, 47 (2000) 1037-44.

- [58] J. H. Youn, J. S. Shin, Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion, *J Immunol* 177 (2006) 7889-97.
- [59] T. Bonaldi, F. Talamo, P. Scaffidi, D. Ferrera, A. Porto, A. Bachi, A. Rubartelli, A. Agresti, M. E. Bianchi, Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion, *EMBO J* 22 (2003) 5551-60.
- [60] N. Isakov, Tyrosine phosphorylation and dephosphorylation in T lymphocyte activation, *Mol Immunol* 30 (1993) 197-210.
- [61] M. L. Hermiston, Z. Xu, A. Weiss, CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells, *Annu Rev Immunol* 21 (2003) 107-37.
- [62] A. R. Anand, R. K. Ganju, HIV-1 gp120-mediated apoptosis of T cells is regulated by the membrane tyrosine phosphatase CD45, *J Biol Chem* 281 (2006) 12289-99.
- [63] S. Liu, H. Ishikawa, N. Tsuyama, F. J. Li, S. Abroun, K. I. Otsuyama, X. Zheng, Z. Ma, Y. Maki, M. S. Iqbal, M. Obata, M. M. Kawano, Increased susceptibility to apoptosis in CD45(+) myeloma cells accompanied by the increased expression of VDAC1, *Oncogene* 25 (2006) 419-29.
- [64] R. Majeti, A. M. Bilwes, J. P. Noel, T. Hunter, A. Weiss, Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge, *Science* 279 (1998) 88-91.
- [65] D. M. Desai, J. Sap, J. Schlessinger, A. Weiss, Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase, *Cell* 73 (1993) 541-54.

- [66] A. M. Bilwes, J. den Hertog, T. Hunter, J. P. Noel, Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase- α by dimerization, *Nature* 382 (1996) 555-9.
- [67] R. Majeti, Z. Xu, T. G. Parslow, J. L. Olson, D. I. Daikh, N. Killeen, A. Weiss, An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity, *Cell* 103 (2000) 1059-70.
- [68] E. Ferrando-May, V. Cordes, I. Biller-Ckovric, J. Mirkovic, D. Gorlich, P. Nicotera, Caspases mediate nucleoporin cleavage, but not early redistribution of nuclear transport factors and modulation of nuclear permeability in apoptosis, *Cell Death Differ* 8 (2001) 495-505.
- [69] J. D. Graves, K. E. Draves, Y. Gotoh, E. G. Krebs, E. A. Clark, Both phosphorylation and caspase-mediated cleavage contribute to regulation of the Ste20-like protein kinase Mst1 during CD95/Fas-induced apoptosis, *J Biol Chem* 276 (2001) 14909-15.
- [70] S. Desagher, A. Osen-Sand, S. Montessuit, E. Magnenat, F. Vilbois, A. Hochmann, L. Journot, B. Antonsson, J. C. Martinou, Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8, *Mol Cell* 8 (2001) 601-11.
- [71] J. Walter, A. Schindzielorz, J. Grunberg, C. Haass, Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retards progression of apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 1391-6.

- [72] S. A. Beausoleil, M. Jedrychowski, D. Schwartz, J. E. Elias, J. Villen, J. Li, M. A. Cohn, L. C. Cantley, S. P. Gygi, Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 12130-5.
- [73] F. W. Porter, A. C. Palmenberg, Leader-induced phosphorylation of nucleoporins correlates with nuclear trafficking inhibition by cardioviruses, *J Virol* 83 (2009) 1941-51.
- [74] M. T. Harreman, T. M. Kline, H. G. Milford, M. B. Harben, A. E. Hodel, A. H. Corbett, Regulation of nuclear import by phosphorylation adjacent to nuclear localization signals, *J Biol Chem* 279 (2004) 20613-21.
- [75] L. F. Pemberton, B. M. Paschal. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export, *Traffic* 6 (2005) 187-98.
- [76] C. Spilianakis, J. Papamatheakis, A. Kretsovali. Acetylation by PCAF enhances CIITA nuclear accumulation and transactivation of major histocompatibility complex class II genes, *Mol Cell Biol* 20 (2000) 8489-98.
- [77] E. Soutoglou, N. Katrakili, I. Talianidis, Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels, *Mol Cell* 5 (2000) 745-51.
- [78] S. H. Liang, M. F. Clarke, Regulation of p53 localization, *Eur J Biochem* 268 (2001) 2779-83.
- [79] D. E. Sterner, S. L. Berger, Acetylation of histones and transcription-related factors, *Microbiol Mol Biol Rev* 64 (2000) 435-59.

- [80] Y. Kawaguchi, A. Ito, E. Appella, T. P. Yao, Charge modification at multiple C-terminal lysine residues regulates p53 oligomerization and its nucleus-cytoplasm trafficking, *J Biol Chem* 281 (2006) 1394-400.
- [81] A. Eberle, R. Reinehr, S. Becker, V. Keitel, D. Haussinger, CD95 tyrosine phosphorylation is required for CD95 oligomerization, *Apoptosis* 12 (2007) 719-29.
- [82] D. M. Snow, G. W. Hart, Nuclear and cytoplasmic glycosylation, *Int Rev Cytol* 181 (1998) 43-74.
- [83] L. Besnault-Mascard, C. Leprince, M. T. Auffredou, B. Meunier, M. F. Bourgeade, J. Camonis, H. K. Lorenzo, A. Vazquez, Caspase-8 sumoylation is associated with nuclear localization, *Oncogene* 24 (2005) 3268-73.
- [84] H. Yang, L. Qu, J. Ni, M. Wang, Y. Huang, Palmitoylation participates in G protein coupled signal transduction by affecting its oligomerization, *Mol Membr Biol* 25 (2008) 58-71.
- [85] C. S. Busso, T. Iwakuma, T. Izumi, Ubiquitination of mammalian AP endonuclease (APE1) regulated by the p53-MDM2 signaling pathway, *Oncogene* 28 (2009) 1616-25.

1.2 ARTICLE II

Objectifs spécifiques de l'article II

Ce deuxième manuscrit présente les travaux sur la caractérisation de l'implication de molécules en aval de la régulation du CD45 dans l'apoptose nucléaire.

En comparant les cellules CD45+ et CD45- les objectifs spécifiques étaient :

- Évaluer le ratio ADP/ATP.
- Analyser la génération de ROS.
- Évaluer l'activation des kinases p38, Erk, JNK, Akt et PKC δ .
- Déterminer l'activation du facteur de transcription NF- κ B.
- Évaluer l'implication de ces dernières molécules dans l'apoptose nucléaire.

Ce manuscrit a été soumis dans la revue *Carcinogenesis*.

Contributions à l'article

J'ai effectué toutes les expériences décrites dans cet article. La rédaction de l'article a été accomplie par moi-même avec l'aide du Dr Jacques Bernier.

Résumé français

L'apoptose, aussi appelée la mort cellulaire programmée, est un type de mort cellulaire finement régulé, essentiel pour le développement normal et l'homéostasie des tissus, qui est impliqué dans plusieurs pathologies. Nous avons antérieurement démontré un rôle pour la molécule CD45, une tyrosine phosphatase transmembranaire de type 1, dans l'apoptose nucléaire induite par des agents chimiques. Contrairement aux cellules T CD45⁺ normales, les cellules T CD45⁻ sont résistantes à la condensation de la chromatine et à la fragmentation internucléosomale de l'ADN, bien que la caspase-3 est activée et le DFF45 clivé. Le but de cette étude était de caractériser le rôle de l'expression du CD45 dans l'apoptose en évaluant les principales voies de signalisation en aval du CD45 et des événements moléculaires impliqués dans l'apoptose. Nos résultats ont démontré un faible ratio ADP/ATP et une inhibition de la génération de ROS chez les cellules CD45⁻ après induction de l'apoptose par le TBT. Le niveau d'expression de Bcl-2 était similaire chez les cellules CD45⁺ et CD45⁻. Suite à l'exposition au TBT, l'absence de l'expression du CD45 augmente l'activité de protéines kinases en aval dont p38, JNK, Akt et PKC δ . De plus, l'activité des MAPKs était spécifiquement régulée selon la présence du CD45. Le facteur de transcription NF- κ B était constitutivement actif chez les cellules CD45⁻. L'utilisation d'inhibiteurs de protéines kinases ne rétablit pas l'apoptose chez les cellules CD45⁻ suggérant un défaut dans la régulation intramoléculaire de l'apoptose nucléaire en absence de l'expression du CD45.

**CD45 Expression on HPB-ALL Cells is Linked to Signaling Pathways
Governing Nuclear Apoptosis.**

Geneviève Dupéré-Minier¹ and Jacques Bernier¹

¹INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7

Corresponding author:

Jacques Bernier
531 boul. des Prairies
INRS-Institut Armand-Frappier
Laval, QC, Canada
H7V 1B7
jacques.bernier@iaf.inrs.ca
450-687-5010 ext 8813
Fax: 450-686-5510

Abstract

Apoptosis, or programmed cell death, is a tightly regulated cell death, essential for normal development and tissues homeostasis involved in numerous diseases. We previously reported a role for the CD45 molecule, a type 1 transmembrane tyrosine phosphatase, in nuclear apoptosis of T cells induced by chemical agents. Contrary to normal CD45⁺ T cells, CD45⁻ cells are resistant to chromatin condensation and internucleosomal DNA fragmentation, despite the fact that caspase-3 is activated and DFF45 is cleaved. The aim of this study was to characterize the role of CD45 expression in apoptosis by evaluating the major downstream pathways and molecular events involved in apoptosis. Our results showed lower ADP/ATP ratio and an inhibition of ROS generation in CD45⁻ cells after induction of apoptosis by tributyltin (TBT). The expression level of Bcl-2 was equivalent in both CD45⁺ and CD45⁻ cell lines. The absence of CD45 expression increased the activity of downstream protein kinases such as p38, JNK, Akt and PKC δ after apoptosis induction. Furthermore, MAPKs activity was specifically regulated by the CD45. The transcription factor NF- κ B was constitutively active in CD45⁻ cells. Specific protein kinases inhibitors did not restore nuclear apoptosis in CD45⁻ cells, suggesting an intramolecular defect in the regulation of apoptosis with the lack of CD45 expression.

Key words

Lymphoma, CD45, Apoptosis, DNA fragmentation, Phosphatase, Kinase, NF- κ B

Abbreviations: APAF-1, apoptotic protease-activating factor-1; CAD, caspase-activated DNase; DFF40, DNA fragmentation factor 40; Ebp1, ErbB-3 binding protein; Erk, extracellular signal-regulated kinase; GSK-3 α/β , glycogen synthase kinase-3 α/β ; ICAD, inhibitor of CAD; JNK, c-Jun NH₂-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinases; MKP-1, MAP-kinase phosphatase-1; MEK, MAPK-Erk kinase; PI3K, phosphoinositide-3 kinase; PKC, protein kinase C; PLC, Phospholipase C; ROS, Reactive Oxygen Species; TBT, Tributyltin; TCR, T cell receptor.

Introduction

Apoptosis is a form of regulated cell death, also known as programmed cell death, which results in the orderly removal of cells that are senescent, unnecessary, defective, damaged or destined to die. Therefore, apoptosis plays a major role in cell removal in development and tissue homeostasis (1). Defects in apoptosis have been implicated in various diseases. For instance, excessive apoptosis can result in neurodegenerative disorders due to cell loss, and defects in apoptosis can promote tumorigenesis by prolonging cell life span, leading to cell accumulation (2,3). Cellular content is not released and inflammation does not occur during apoptosis, contrary to necrosis that is an accidental cell death characterized by swelling and rupture of the cell, leading to an inflammation (4). The process of apoptosis is associated with a distinct set of physical and biochemical changes, including cell volume reduction, pH acidification, phosphatidylserine externalization, chromatin condensation, DNA degradation of high molecular weight (50-300 kbp), internucleosomal DNA fragmentation (180-200 bp), and formation of apoptotic bodies engulfed by neighboring phagocytes (5). Induction of apoptosis cell death is mediated by two central pathways, an extrinsic pathway involving cell surface death receptors, and a mitochondrial intrinsic pathway (6). Mitochondrial intrinsic cell death pathway is induced, among others, by toxic compounds, chemotherapeutic agents and DNA damaging agents such as ultraviolet radiation (7). During mitochondrial cell death pathway, there is a loss of mitochondrial transmembrane potential followed by cytochrome c and apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) released in presence of dATP or ATP, resulting in the formation of the apoptosome. The apoptosome complex recruits and activates the initiator caspase-9 to form the active processing complex that

subsequently activates effector caspases such as caspase-3 (8). Perturbation of the inner membrane electrochemical gradient is mediated, among others, by the Bcl-2 family members that regulate the mitochondrial permeability through their expression level, dimerization and phosphorylation (8-10).

Nuclear apoptosis is characterized by chromatin condensation, internucleosomal DNA fragmentation and nucleus disintegration. The principal nuclease responsible for this nuclear apoptosis is the DNA fragmentation factor 40 (DFF40), also known as caspase-activated DNase (CAD). In proliferating cells, DFF40 is expressed with its molecular chaperone and inhibitor, the DFF45 (inhibitor of CAD, ICAD) (11,12). DFF complex is a heterodimer that can also form heterotetramers or dimers of heterodimers (12-15). During apoptosis, DFF45 is cleaved by caspase-3 and caspase-7 (16-17) releasing DFF40 from the complex allowing the nuclease to form high molecular weight homo-oligomers and to generate double-stranded breaks in the chromatin (14,17-18). DFF40 nuclease can be regulated by various activator or inhibitor proteins. The molecular chaperones HSC70 and HSP40 mediate the proper folding of the DFF heterodimer during translation (19). DFF40 DNase activity is enhanced by specific chromosomal proteins: histone H1, HMGB1/2 and topoisomerase II (17,20-21). In addition, phosphorylation of histone H2A.X has been shown to be necessary for DNA fragmentation by DFF40 (22). The complexes nucleophosmin (B23)/PI3P and Ebp1/Akt inhibit the nuclease due to their binding capacity to the activated DFF40 (23,24). The DFF45/40 heterodimer complex can bind to the CIIA protein, resulting in an inhibition of the nuclease (25). DFF40 nuclease activity is also inhibited by poly-anions, such as heparin, polyglutamic acid,

poly(ADP-ribose) and nucleic acids (single stranded DNA, RNA and DNA-RNA heteroduplexes) (26,27). Ionic homeostasis is a factor that regulates DFF40 endonuclease activity as the nuclease requires cofactors such as Cl⁻ efflux, intracellular Ca²⁺ elevation and neutral pH to be fully active (28).

CD45 is an essential regulator of T- and B- cell antigen receptor signaling (29). The major role of CD45 is to regulate the signaling thresholds of receptors expressed on immune cells. CD45-deficient T cells are unable to proliferate or to produce cytokines in response to antigen, or to cross-linking of the T cell receptor (TCR) with anti-CD3 antibodies (30). One of the key steps that initiate receptor activation is the tyrosine phosphorylation of TCR subunits by the Src family protein kinases p56lck and p59fyn. By dephosphorylating a negative regulatory residue at the C-terminal end of p56lck and p59fyn, CD45 plays a positive regulation of TCR in T cells, which increases their kinase activity and activation of the cell (31). The TCR phosphorylated by p56lck and p59fyn recruits the ZAP-70 protein kinase to the receptor complex, which becomes activated and stimulates downstream pathways such as the mitogen-activated protein kinases (MAPKs), the phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/Akt and the phospholipase C (PLC)/protein kinase C (PKC) cascades (32,33). Although the MAPKs, PI3K/Akt and PLC/PKC cascades represent major pathways downstream of TCR signalization for activation, these pathways are key factors in the cell survival, or in the cell death as anti- or pro-apoptotic regulators (34-36).

CD45 involvement in apoptosis has been reported (37-40). Interestingly, the absence of DNA fragmentation was noted with CD45 cross-linking-mediated apoptosis (37,38). We

previously showed an implication of this tyrosine phosphatase in apoptosis induced by mitochondrial perturbing agents (41,42). T cells that have spontaneously lost the CD45 expression are resistant to nuclear apoptosis. Thus, CD45⁻ cells do not have chromatin condensation and DNA fragmentation. We showed that CD45-deficient cells have an impaired ionic homeostasis regulation resulting from the inhibition of chloride channel phosphorylation under the Src family regulation (41). Interestingly, although the nuclear apoptosis was absent, upstream event of apoptosis occurs normally (42). As a matter of fact, CD45-positive and CD45-negative T cell lines had intracellular calcium mobilization, mitochondrial membrane potential dissipation, cytochrome c releases from mitochondria, caspase-3 activation and DFF45 cleavage. On the other hand, subcellular partitioning experiments showed a decrease in nuclear localization of caspase-3 and DFF40 in CD45-deficient cells. Cell-free systems also revealed that the defective signal in CD45-deficient cell lines was located in the cytoplasm downstream of caspase-3 activation. Furthermore, DNA fragmentation was induced in cells deficient in the expression of p56lck, ZAP-70 and SHP-1, excluding the possible implication of these CD45 substrates and the implication of SHP-1, another tyrosine phosphatase. In this work, we analyzed cellular signaling pathways between CD45⁺ and CD45⁻ cells, which can be linked to the absence of nuclear apoptosis.

Materials and methods

Cell culture

HPB-ALL (Pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia cell line) 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 (Sigma-Aldrich) culture medium supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 50 µM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Cells were maintained at 37°C under 5 % CO₂.

Cell treatments

Apoptosis was induced by TBT (Tributyltin chloride 97 % purity, Sigma, Wisconsin, USA) as described before (42). Briefly, cells (1X10⁶ cells/ml) were exposed to 0.8 µM of TBT for different periods of time (1-6 hrs) at 37°C. For the pharmacological inhibitors experiment, cells were incubated for 60 min at 37°C with various inhibitors prior TBT exposition at the following concentrations: 10 µM of SB203580 (an inhibitor of p38 MAPK), 10 µM of SP600125 (a JNK-specific inhibitor), 100 nM of Wortmannin (a Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/Akt pathway inhibitor), 20 nM of Staurosporin (a specific inhibitor of PKC (Sigma-Aldrich)), 10 µM of U0126 (an inhibitor of Erk MAPK activation), 10 µM of 6-Amino-4-(4-phenoxyphenyl-ethylamino) quinazoline (a NF-κB activation inhibitor (Calbiochem, New Jersey, USA)). All these inhibitors were prepared in DMSO, and the final DMSO concentration did not exceed 0.1%.

Apoptosis assessment

Cell cycle analysis was performed as described before (42). Briefly, treated cells were washed, resuspended in Krishan Buffer (0.3% NP-40, 0.1% Sodium Citrate and 50 µg/ml propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich)) containing 0.5 mg/ml of RNase, incubated 60 min at 37°C and analyzed by flow cytometry on a FACScan[®] (Becton Dickinson, Oakville, Ontario, Canada).

Evaluation of ADP/ATP ratio

The ADP/ATP ratio was evaluated using the ApoSENSOR[™] ADP/ATP Ratio Assay kit (Biovision, Mountain View, California, USA) according to the manufacturing protocol. Briefly, 1×10^3 cells were transferred onto a luminometer plate and 100 µl of Nucleotide Releasing Buffer was added for 5 minutes at room temperature with gentle agitation. For ATP measure concentration, 1 µl of ATP Monitoring Enzyme was added to the cell lysates. The samples were read in after 1 minute in a luminometer SpectraMax M5[®] from Molecular Devices (Data A). To measure the ADP level in the cells, the samples were read again after 10 minutes (Data B), then 1 µl of ADP Converting Enzyme was added and samples were read after 1 minute (Data C). The ADP/ATP ratio was calculated as: $(\text{Data C} - \text{Data B}) / \text{Data A}$.

Evaluation of Reactive Oxygen Species (ROS) production

Cells were washed and resuspended in PBS containing 5 µM of H₂DCFDA (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). After 15 min incubation at 37°C, cells were washed and

exposed to 0.8 M of TBT for 2 to 4 hours at 37°C. ROS production was analyzed by flow cytometry on a FACScan[®] (Becton Dickinson, Oakville, Ontario, Canada).

Transfection of NF- κ B

Transient transfection of pNF κ B-Luc (Stratagene, La Jolla, California, USA) was performed as described before (43). Briefly, transfection was performed according to the manufacturer's instructions in CD45+ and CD45- cells using Lipofectamine[™] (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), a cationic lipid reagent. After 48 hours of incubation, cells were collected, exposed to TBT for 4 hours and deposited in a luminometer microplate. Samples were lysed and incubated for 30 min at room temperature. The luciferase activity was measured with a Dynex Technologies, MLX, Microtiter Plate Luminometer using the activation buffer (20 mM tricin, 1.07 mM (MgCO₃)₄·Mg(OH)₂·5H₂O, 2.67 mM MgSO₄, 0.1 mM EDTA, 270 μ M Coenzyme A, 470 μ M luciferin, 530 μ M ATP and 33.3 mM DTT). Luciferase values were normalized with the co-transfection of a β -galactosidase vector.

Akt Activity Immunoassay

The evaluation of Akt activity was performed using the Nonradioactive Akt kinase assay kit (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA), and the immunoassay was done as recommended by the company. After TBT exposition, 15X10⁶ cells were resuspended in 500 μ l of lysis buffer with 1 mM of PMSF and incubated 5 minutes on ice. Lysates were then sonicated on ice, microcentrifuged for 10 min at 4°C and 200 μ l of the supernatant was subjected to immunoprecipitation. For this purpose, 20 μ l of immobilized Akt

antibody bead slurry was added to the supernatant and incubated overnight at 4°C. Cell lysates were then centrifuged at 14 000xg for 30 seconds at 4°C, pellets washed two times with 500 µl of 1X lysis buffer, one time with 500 µl of 1X kinase buffer and then resuspended in 50 µl of 1X kinase buffer supplemented with 1 µl of 10 mM ATP and 1 µg of GSK-3α/β fusion protein. Samples were incubated for 30 min at 30°C and the reaction was terminated by the addition of 25 µl of 3X SDS sample buffer. Samples were heated, subjected to a SDS-PAGE, and immunoblotted with an anti-phospho-GSK-3α/β antibody.

Preparation of cytoplasmic and nuclear extracts

Cells were washed and resuspended in 225 µl of extraction buffer (10 mM Hepes pH 6.5, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM NaF, 0.1 mM DTT, 0.2 mM sodium orthovanadate, 0.4 mM PMSF, 0.3 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin). The samples were then incubated on ice for 20 minutes and the nuclei were removed by centrifugation at maximum speed for 10 min at 4°C. The resulting supernatant was used as the cytoplasmic extract. Both nuclei (7.5X10⁶) and cytoplasmic extracts (150 µg) were resuspended in sample buffer and analyzed by western blotting.

Western blotting

Proteins from equal amounts of whole cell lysates (1X10⁶ cells/lane) or from immunoprecipitation were loaded on a 7.5 %, 10% or 15 % SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE), separated and transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, California, USA). As described before (42), membranes were blocked and probed with

desired antibodies: anti-phospho-p38, anti-Erk (Biosource International inc., California, USA), anti-phospho-Erk, anti-phospho-JNK, anti-JNK, anti-phospho-GSK-3 α/β , anti-PKC δ , anti-phospho-PKC δ (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA), anti-p38, anti-MKP-1, anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA), anti-EBP1 (Abcam Inc., Cambridge, Massachusetts), anti-Akt (eBioscience, San Diego, USA), anti-phospho-H2A.X (Upstate Biotechnology, New York, USA) or anti-actin (Sigma-Aldrich). Detection was accomplished using a horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA) or a horseradish peroxidase-labeled anti-mouse antibody (GE Healthcare). Visualization of the bands was done by chemiluminescence with the Ecl+ system (Amersham Biosciences).

Statistical Analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA with the Tukey comparison test using the GraphPad InStat 3.05 software program (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Differences between groups were considered statistically significant when the probability by chances was $< 5\%$ (* = $P < 0.05\%$, *** = $P < 0.001\%$).

Results

Contrary to CD45+ cells, the ADP/ATP ratio in CD45- cells stays low and the ROS generation is absent after TBT-induced apoptosis.

Intracellular ATP represents a molecular switch in the decision between apoptosis and necrosis (44). Moreover, ATP is required before nuclear changes can occur, suggesting its importance in chromatin condensation and DNA fragmentation (45). We have showed that HPB45.0 (CD45-) cell line does not undergo nuclear apoptosis after apoptosis induction with mitochondrial perturbing agents (41,42). Stridh et al.,(46) showed that tributyltin-induced apoptosis requires ATP at both the mitochondrial and caspase activation levels. To determine changes in energetic balance in both CD45+ and CD45- cells, we have evaluated the ADP/ATP ratio following TBT-induced apoptosis. Generally, a modest decrease in the levels of ATP, and increased levels of ADP are recognized in apoptotic cells. After 4 hours of vehicle exposition (V), the ADP/ATP ratio was very low in both cell lines, 0.38, a ratio representative of proliferating cells (Figure 1A). After 2 hours of TBT exposition, the ADP/ATP ratio increased in both cell lines to a value of 0.5. After 4 hours of TBT incubation, the ADP/ATP ratio was higher in CD45+ cells, a ratio representing an apoptosis mode of cell death. We have previously showed DNA fragmentation at this later time point (42). Consequently, the change in the ADP/ATP ratio found here represents the late apoptosis event. In contrast, ADP/ATP ratio for CD45- cells remained stable between 2 to 4 hours of TBT exposure. When we analyzed the percentage of change in intracellular ATP after 4 hours of TBT exposition, there was a marked reduction by 88% in HPB-ALL compared to only 60% for HPB45.0.

Production of reactive oxygen species (ROS) is a typical sign of apoptosis, and mitochondria play a central role not only in ATP production but also in ROS generation (47). We have previously demonstrated a perturbation in mitochondria permeability and cytochrome c release in both CD45+ and CD45- cell lines (42). Moreover, mitochondrial perturbing agents, such as TBT, induce the production of ROS contributing to the induction of apoptosis (48-50). Next, we determined the ROS production in both CD45+ and CD45- cell lines with the fluorescent probe H₂DCFDA. After 2 hours of TBT exposition, ROS generation was already high in CD45+ cells, and 2 hours later ROS generation was slightly increased (Figure 1B). Interestingly, ROS production was low for up to 4 hours of TBT exposition in CD45- cells, suggesting a link between CD45 expression and ROS generation. Members of the Bcl-2 family exert pro- or anti-apoptotic effects. The Bcl-2 member is a well-known anti-apoptotic protein that suppresses apoptosis (51). Over-expression of Bcl-2 delays apoptosis, prolongs the life span and confer resistance to toxic agents (52-54) . The production of ROS controls the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination (55). As demonstrated in Figure 1C, the Bcl-2 expression level was equivalent in both CD45-positive and CD45-negative cell lines. Thus, Bcl-2 expression level was not modulated in T cells that lost the CD45 expression, which cannot explain the absence of nuclear apoptosis.

TBT-induced apoptosis causes an increase of p38, Erk and JNK MAPkinases phosphorylation in CD45- cells contrary to CD45+ cells.

It is known that generation of ROS activates members of MAPKs family (56-57). These serine-threonine protein kinases are sensitive to cellular stress and thereby they are modulated in response to a variety of extracellular stress stimuli (58). In mammalian cells, three major MAPK signaling pathways have been identified, including p38 MAPK, extracellular signal-regulated kinase-1/-2 (Erk-1/-2) and c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK). MAP kinase pathways are involved in cell growth, differentiation and apoptosis, but the specific role of each kinase member in apoptosis remains controversial and is specific to the cell type (59). MAPKs signal is downstream of the TCR signalization pathway and thus downstream of the CD45 molecule regulation. We determined the activation state of p38, Erk-1/-2 and JNK by western blotting, evaluating their phosphorylation states. Basal activity of MAPKs has never been investigated in HPB-ALL and HPB45.0. The MAPKs activity differs in the control treatments of both cell lines. As shown in Figure 2, we observed an absence of phosphorylation for p38 and JNK in CD45+ cells, although ERK was present in a phosphorylated form. Interestingly, the absence of CD45 expression led to an opposite MAPKs activity. TBT-induced apoptosis in CD45+ cells caused a strong increase of p38 phosphorylation after 2 hours, followed by a return to the control level after 4 hours. The same pattern of activation was observed for JNK in CD45+ cells. In contrast, TBT-induced apoptosis did not affect the p38, and slightly affected JNK in absence of CD45 expression (Figure 2). In both CD45+ and CD45- cells, JNK-2 was cleaved after a 4 hours exposure to TBT. We obtained no

increase of Erk-1/-2 phosphorylation in CD45+ cell lines exposed to TBT, although a dephosphorylation occurred after 4 hours (Figure 2). In CD45- cells, the expression of Erk-1 was very weak (44 kDa). TBT-induced apoptosis transiently increased Erk-2 phosphorylation. Overall, we showed an opposite activation of MAPKs family between cells expressing CD45 and those that did not express this phosphatase. Transient activation of p38 and JNK in CD45+ cells prompted us to determine MAP-kinase phosphatase-1 (MKP-1) induction. MKP-1 has a central function in the feedback control of p38 and JNK activity (60). MKP-1 was constitutively expressed in HPB-ALL, and the expression level remained stable for up to 4 hours after TBT-induced apoptosis (Figure 2). MKP-1 expression level was weak in the control treatment of CD45- cells, and no further induction occurred after TBT exposure. Together, these results demonstrated that different MAPKs pathways were activated in cells that had lost the CD45 expression, suggesting their possible involvement in the control of late event of apoptosis

Akt is partially cleaved while its activity is increased after apoptosis induction in CD45- cells.

The PI3K/Akt pathway is involved in the regulation of numerous cellular processes such as cell growth, proliferation, transcription and apoptosis. The anti-apoptotic proto-oncogene Akt has been shown to be implicated in the molecular pathogenesis of a variety of human malignancies (61). Thus, we verified if Akt could have a role in the lack of apoptosis in CD45- cell lines. We first verified the level of expression of Akt in both CD45+ and CD45- cell lines (Figure 3A). Akt expression level was higher in CD45- cells

than in CD45⁺ cells. During apoptosis, Akt is known to be cleaved by caspase-3 (62). After 4 hours exposure to TBT, Akt was completely cleaved in CD45⁺ cells, while only partially cleaved in CD45⁻ cells. We next verified Akt activity by immunoprecipitation of Akt and determined its capacity to phosphorylate the glycogen synthase kinase-3 α/β (GSK-3 α/β). Akt activity was very high in the control treatment of CD45⁺ cells and its activity is almost completely abolished after apoptosis induction, as Akt was cleaved (Figure 3B). In contrast, Akt activity in the control treatment of CD45⁻ cells was weaker but significantly higher than in CD45⁺ cells following TBT-induced apoptosis. Normally, Akt is primarily localized in the cytoplasm, but it can also localize to the nucleus or translocate to the nucleus upon stimulation (63). The anti-apoptotic role and interaction in cellular survival of Akt is complex but involves the phosphorylation of nuclear substrates or interaction with nuclear proteins. For instance, Akt phosphorylates acinus, thereby inhibiting acinus cleavage and inhibiting chromatin condensation mediated by acinus (64). A recent study demonstrated that nuclear Akt interacts with B23/nucleophosmin, a nucleolar phosphoprotein, and protects it from proteolytic cleavage, enhancing cell survival (65). We previously demonstrated that caspase-3 and DFF40 have a defect in cellular localization (42). As nuclear Akt seems to have much more anti-apoptotic effects, we verified the Akt localization in both CD45⁺ and CD45⁻ cells by subcellular fractionation. As shown in Figure 3C, Akt was mainly localized in the cytoplasm and seemed to be present to the same extent in the nucleus of both cell lines. Together, these results demonstrated that Akt is partially cleaved and active after apoptosis induction in CD45-deficient cells. However, Akt nuclear localization cannot be associated with the absence of nuclear apoptosis in CD45⁻ cells.

PKC delta is constitutively cleaved in CD45- cells and EBPI cleavage is not required for nuclear apoptosis in HPB-ALL T cells.

Another major signaling pathway in T cells is the PLC/PKC cascade. The PKC family of serine/threonine kinases is composed of various isoforms that regulate numerous cellular functions, including proliferation and survival. PKC α , β , ϵ and ζ play a role in the cell survival, while PKC δ is a critical pro-apoptotic signal in many cell types (36,66) . As PKC δ has emerging roles in apoptosis we have determined the PKC δ status in both CD45+ and CD45- cell lines. After apoptosis induction, it is known that PKC δ is cleaved by caspase-3, forming a constitutively active catalytic fragment (δ CF) and promotes apoptosis (36). In CD45+ cells, PKC δ (intact PKC δ : 78 kDa) was partially cleaved after 2 hours exposure to TBT and completely cleaved after 4 hours (Figure 4A, middle panel). The cleavage generated two fragments of 40 kDa and 36 kDa, where the 40 kDa fragment represents the active phosphorylated catalytic fragment (Figure 4A, upper panel). Interestingly, in control CD45- cells PKC δ was expressed only into an active catalytic fragment of 40 kDa and its phosphorylation was diminished after apoptosis induction. As PKC δ was constitutively active in CD45- cells we next verified if ErbB-3 binding protein (Ebp1) was cleaved after apoptosis induction in these cells. Ebp1 is a member of the PA2G4 family of proliferation-regulated proteins, thus it is involved in cellular growth and proliferation (67). It has been reported that when Ebp1 is phosphorylated by PKC, it promotes cell survival by preventing apoptotic DNA fragmentation through the formation of an Ebp1 complex with active nuclear Akt (24). This complex prevents DNA

fragmentation by inhibiting the caspase-activated DNase (CAD or DFF40). However, it was also demonstrated that Ebp1 phosphorylation by PKC δ inhibits Ebp1 degradation, thus enhancing cell survival (68). As PKC δ seemed to be constitutively activated in CD45⁻ cells, we verified if a lack of Ebp1 cleavage could be responsible for the absence of DNA fragmentation. As shown in Figure 4B, Ebp1 cleavage did not occur neither in CD45⁺ nor CD45⁻ cells after apoptosis induction by TBT. These results showed that PKC δ was constitutively expressed as an active catalytic fragment in CD45⁻ cells and that Ebp1 cleavage is not required in HPB-ALL T cells for apoptosis induction.

NF- κ B is constitutively active in CD45⁻ cells.

CD45-deficient T cell lines such as HPB45.0 have NF- κ B constitutively active during infection of the HIV-1 LTR contrary to normal T cells (69). As the three major pathways (MAPKs, PI3K/Akt, and PLC/PKC) are activated in CD45-deficient cells, we analyzed the NF- κ B activation in our model. For this purpose, CD45-positive and CD45-negative were transiently transfected with NF- κ B Luciferase reporter vector and the activity was determined. As shown in Figure 5, NF- κ B is constitutively active in CD45⁻ cell lines contrary to CD45⁺ cells. While NF- κ B activation decreased during TBT treatment in CD45⁻ cells, it was still active after 4 hours exposure to TBT. NF- κ B was not activated in the control of CD45⁺ cells, even after TBT-induced apoptosis. PMA stimulation was used for transfection control, and NF- κ B was activated in both cell lines though to a greater extent (fourfold) with the CD45⁺ cells (data not shown). These data indicated that the lack of CD45 expression induces NF- κ B activation.

Inhibition of MAPKs, PI3K/Akt, PKC δ or NF- κ B is not sufficient to allow DNA fragmentation in CD45-deficient cells.

We next used inhibitors of the three major signaling pathways (MAPKs, PI3K/Akt, PKC) and of NF- κ B activation to see if we could induce a DNA fragmentation in CD45- cells. Before TBT treatment, cells were incubated with specific inhibitors and DNA fragmentation was evaluated through flow cytometry by cell cycle analysis after PI labelling. The inhibitors used were: SB203580 a specific inhibitor of p38 (70) , U0126 a specific inhibitor of MAPK-Erk kinase (MEK) thus inhibiting Erk (71) , SP600125 a specific JNK inhibitor (72), Wortmannin an inhibitor of the PI3K/Akt pathway (73), Straurosporin a pan-PKC inhibitor (74) and 6-Amino-4-(4-phenoxyphenylethylamino)quinazoline a specific inhibitor of NF- κ B activation (75). Exposition with each specific inhibitor did not induce a DNA fragmentation in CD45-deficient cells (Figure 6, lower panel). However, in CD45+ cells the PKC inhibitor and the NF- κ B activation inhibitor diminished DNA fragmentation demonstrating that one or more PKC family members and NF- κ B have pro-apoptotic roles in our model. These data indicated that the use of one specific inhibitor alone is not sufficient to induce a DNA fragmentation in CD45- cells.

Discussion

Apoptosis has attracted great attention in the past years due to its importance as a biological phenomenon, and its failure contributes to a variety of diseases. Nuclear apoptosis is not an essential event to the cell death but it has been suggested that oligonucleosomal DNA fragmentation reduces the risk of transferring genetic information from apoptotic cancer cells to neighboring cells (76) and also minimizes the production of auto-antibodies against heterochromatin associated with auto-immune disease (11). Therefore, understanding the nuclear apoptosis regulation is of great importance. Many studies have reported a defect in nuclear apoptosis despite the fact that caspase-3 was activated and DFF45 cleaved (77-80). We have previously shown that T cells lines that have lost CD45 expression are resistant to nuclear apoptosis induced by mitochondrial perturbing agents, despite the fact that caspase-3 is activated and that the DFF45 is cleaved (42). Transfection of CD45 cDNA into negative cells led to the restoration of DNA fragmentation as observed in wild type cells. CD45 involvement in apoptosis is restricted to the cell type as CD45 is expressed exclusively in nucleated haematopoietic cells. Many studies reported a CD45 implication in apoptosis by directly triggering the molecule. Indeed, the triggering of CD45 with monoclonal antibodies in thymocytes, T cells, B cells and eosinophiles induces or increases apoptosis (37-40). Interestingly, the absence of DNA fragmentation was also reported with CD45 crosslinking-mediated apoptosis (37,38). The lack of DNA fragmentation could be explained by an inhibition of CD45 phosphatase activity, due to intermolecular blocking of the CD45 catalytic site. Indeed, CD45 binding induces its dimerization and this interaction results in inhibiting its phosphatase activity (81-84).

It remains unclear how mitochondrial ROS production is regulated during apoptosis and how the ROS are involved in the apoptotic events. ROS are mainly produced by mitochondria and an excess of ROS in mitochondria causes an oxidative stress with an enhanced activity of the antioxidant defense system and mitochondrial damage (85). Surprisingly, apoptosis induction by a mitochondrial perturbator in CD45-deficient cells did not induce a significant level of ROS generation (Figure 1B) contrary to normal CD45+ cells. It has been shown that ROS production can act upstream of mitochondrial membrane depolarization and cytochrome c release (86,87). In our model, the absence of ROS production in CD45- cells does not interfere with the initiation of apoptosis to the mitochondrial level as mitochondrial potential is disrupted and cytochrome c is released (42). Studies have reported that Bcl-2 can protect cells from apoptosis by shifting the cellular redox to a more reduced state (87,88). Inhibition of apoptosis and of ROS production in CD45- cells is not related to an over-expression of Bcl-2 as the expression level is equivalent in CD45+ and CD45- cells (Figure 1C). The inhibition of ROS generation in CD45- cell lines could influence the execution phase of apoptosis by oxidative modification of specific proteins that is probably critical for apoptosis. Since the molecular mechanism of ROS production is not well understood yet, the lack of ROS generation in cells that have lost CD45 cannot be explained. However, as there is a hyperphosphorylation state in CD45- cells (41), the lack of CD45 expression could be a deregulation of phosphorylation/dephosphorylation event involved in the ROS production. For example, cytochrome c as recently been identified to be the target of cell

signaling pathways through phosphorylation and its phosphorylation on tyrosin-48 inhibits mitochondrial respiration (89,90).

ROS production is known to activate signaling pathways. For instance, ROS activate MAPKs, Akt and NF- κ B (91-95). The activity of these factors was increased in CD45- cell lines. ROS were generated to a very low extent in CD45- cells, thus they were not responsible for the increased activity of those signaling pathways in CD45- cells. It was reported that the principal CD45 substrate, p56lck, is hyperphosphorylated in CD45- cells and that the kinase activity of p56lck from cells lacking CD45 is substantially increased(96). As p56lck is upstream the three major signaling pathways (MAPKs, PI3K/Akt, PKC), it was not surprising to identify an increase of activation of those pathways (Figures 2, 3 and 4). The p38, Erk-1/-2 and JNK MAPkinases have been reported to be involved in apoptosis cell death (35). However, MAPKs role in apoptosis is very contradictory as their implication changes upon the cell type and the apoptosis inducer, being anti-apoptotics or pro-apoptotics proteins (97-101). Lower levels of Erk-1 and JNK-1 (Figure 2) expression in CD45-deficient could be factors to considerate, but the overall increase activation of molecules in CD45- cells seemed to be a better explanation for the lack of apoptosis. The CD45 molecule specifically regulates the pattern of MAPKs phosphorylation during TBT exposition. In proliferating CD45- cells, Erk is not activated while it is constitutively activated in proliferating CD45+ cells. In contrast, p38 and JNK are not activated in proliferating cells CD45+ while they are activated in CD45- cells. As p38 and JNK are activated after 2 hours exposure to TBT and return to the control level after 4 hours of incubation, they therefore seem to have

pro-apoptotic role in CD45⁺ cells. In CD45⁻, as Erk is activated only after 2 hours exposure to TBT Erk seems to have an anti-apoptotic role in those cells. The level state of MAPKs phosphorylation seems to be an important feature in our model and there is a significant regulation of these kinases by the CD45 molecule.

The proto-oncogene Akt is a good candidate for the inhibition of apoptosis. Despite the fact that nuclear localization of Akt is not increased in CD45-negative cells, its activity is higher than in CD45⁺ cells after apoptosis induction and it is only partially cleaved (Figure 3). An impairment of Akt cleavage is not surprising as we previously reported a defect in the proteolytic cleavage of some proteins in CD45-deficient cells (42). It has been reported that Akt phosphorylation can inhibit its own cleavage mediated by caspase-3 (62). Thus an increase of Akt phosphorylation in CD45⁻ cells could be responsible for the impairment of Akt cleavage. The PI3K/Akt wortmannin inhibitor did not restore nuclear apoptosis in the CD45⁻ cells (Figure 6) but Akt could still play a role in parallel with other kinases. PKC δ is a multifunctional kinase involved in cell proliferation and cell death (36). Expression of PKC δ KD (kinase dead PKC δ) inhibits apoptosis induced by numerous stimuli (102). Many putative substrates of PKC δ have been identified such as transcription factors, structural proteins and other protein kinases but the regulation of apoptosis by PKC δ is not well understood (36). Since PKC δ is constitutively activated in CD45⁻ cells, the lack of apoptosis in these cells is probably not related to this kinase (Figure 4A). The formation of a constitutively active catalytic fragment (δ CF) by caspase-3 is preceded by PKC δ phosphorylation following apoptosis induction (36). A hyperphosphorylation state of proteins (41) and of protein kinases in CD45⁻ cells can

explain the cleavage of PKC δ in proliferating CD45⁻ cells by a yet unknown protease. Inhibition of PKC δ by a pan-PKC specific inhibitor inhibited DNA fragmentation in CD45⁺ cells, confirming the pro-apoptotic role of this kinase in apoptosis (Figure 6). Ebp1 cleavage does not seem to be required in our model since it is cleaved in CD45⁺ cells (Figure 4B). Thus, Ebp1 requirement for DNA fragmentation is probably cell type specific as previous studies were done with neuronal cells (24,68).

All three major signaling pathways were upregulated in CD45⁻ cells and NF- κ B activation was increased in these cells (Figure 5). The transcription factor NF- κ B has a dual role, inducing apoptosis by upregulating the expression of pro-apoptotic proteins such as Fas, FasL, c-Myc or acting as a survival factor by upregulating anti-apoptotic protein such as Bcl-2, Bcl-xL, c-IAP-1/-2 (103). It has been reported that a constitutive activation of NF- κ B stimulates oncogene expression and induces tumorigenesis (104). In our model, even though NF- κ B was constitutively activated in CD45⁻ cells, inhibition of this transcription factor did not restore DNA fragmentation (Figure 6). Partial inhibition of DNA fragmentation in CD45⁺ cells comes from the pro-apoptotic role of NF- κ B in the initiation of apoptosis surely occurring after 0 to 2 hours of exposure to TBT. The use of specific kinase inhibitors did not restore DNA fragmentation in CD45⁻ deficient cells (Figure 6). The lack of apoptosis in the absence of CD45 expression is probably due to a combination of the upregulation of various kinases activities. For example, the utilization of general protein tyrosine kinase inhibitors such as genistein did not restore apoptosis (Data not shown) as protein tyrosine kinase activity is also required to induce apoptosis

(41). Activation of protein kinases and NF- κ B activation suggests that there is an increase of pro-apoptotic proteins inhibiting apoptosis in CD45- cells.

In conclusion, the results presented in this study demonstrated the molecular importance of the CD45 expression in apoptosis induction by controlling intracellular signalization. Contrary to wild type cells, CD45-deficient cells were resistant to nuclear apoptosis. After apoptosis induction with TBT treatment, CD45- cells had lower levels of ADP/ATP ratio than CD45+ cells and ROS generation was inhibited. However, Bcl-2 level expression was similar in CD45+ and CD45- cell lines. There is an upregulation of protein kinases activation downstream of CD45 regulation and a constitutively activation of NF- κ B. It was reported that the CD45 expression is lost in over 10% of patients with acute lymphoblastic lymphoma (105) and also frequently lost in patients with Hodgkin's lymphoma and multiple myelomas (106-108). Furthermore, patients with CD45-multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45+ multiple myeloma (109). Thus, identifying molecular defects in the lack of nuclear apoptosis during the lost of the CD45 expression would be useful to eventually develop new molecular therapies.

Acknowledgments

This study was supported by NSERC: Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

Figure Legends

Figure 1: After TBT exposition, ADP/ATP ratio is lower and ROS generation is inhibited in CD45- cell lines but Bcl-2 expression is similar in both CD45+ and CD45- cell lines. A) HPB-ALL (CD45+) and HPB45.0 (CD45-) cells were TBT-treated for 4 hrs with 0.8 μ M TBT or vehicle alone (EtOH: 0.1%) at 37°C. ADP/ATP ratios were calculated after 2 and 4 hrs exposure to TBT and after 4 hrs exposure to vehicle. The ADP/ATP ratios are means \pm S.E.M. from three different experiments (*** $P < 0.001$). B) HPB-ALL (CD45+) and HPB45.0 (CD45-) cell lines were exposed to 5 μ M of the CM-H₂DCFDA indicator for 15 min at 37°C before exposure to TBT. Production of reactive oxygen species was analyzed by flow cytometry. These experiments are representative of three independent experiments. C) After 4 hrs of TBT exposure or vehicle alone (EtOH: 0.1%), HPB-ALL (CD45+) and HPB45.0 (CD45-) cells were analyzed for Bcl-2 expression. Whole cell protein extracts (1×10^6 cells) were loaded on a 7.5% SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-Bcl-2 antibody. Anti-actin antibody was used as a loading control. These experiments are representative of three independent experiments.

Figure 2: Phosphorylation state of p38, JNK and Erk are increased in CD45-deficient cells. HPB-ALL (CD45+) and HPB45.0 (CD45-) were TBT-treated for 2 hrs or 4 hrs with 0.8 μ M TBT, or for 4 hrs with vehicle alone (EtOH: 0.1%). Whole cell protein extracts (1×10^6 cells) were loaded on a 10% SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-phospho-p38 antibody, an anti-phospho-JNK antibody, an anti-phospho-Erk antibody or

an anti-MKP-1 antibody. Anti-p38, anti-JNK, anti-Erk, and anti-actin antibodies were used respectively as loading controls. These experiments are representative of three independent experiments.

Figure 3: Partial cleavage of Akt, increases of its activity but no perturbation of its localization in apoptotic CD45- cells. CD45-positive cells and CD45-negative cells were exposed to 0.8 μ M of TBT for 4 hrs or vehicle alone (EtOH: 0.1%). A) Whole cell protein extracts (1×10^6 cells) were separated on a 7.5% SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-Akt antibody. B) After treatment, cells (15×10^6) were lysed and Akt was immunoprecipitated using an anti-Akt antibody. Akt kinase activity was evaluated by incubation of the immunoprecipitated Akt with a substrate, the GSK-3 α/β fusion protein. Akt activity was evaluated by determination of GSK-3 α/β phosphorylation on a 7.5% SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-phospho-GSK-3 α/β antibody. C) After isolation of the cytoplasmic extracts and nuclei, both cytoplasmic (150 μ g) and nuclear proteins (7.5×10^6 nuclei) were separated on a 7.5% SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-Akt antibody. A), B) and C) These experiments are representative of three independent experiments.

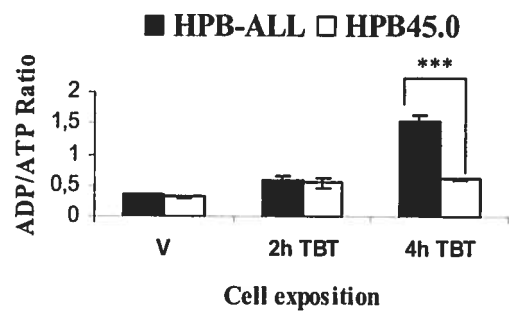
Figure 4: PKC delta is constitutively cleaved in CD45- cells and EBP1 is not cleaved in both CD45+ and CD45- cells. HPB-ALL (CD45+) and HPB45.0 (CD45-) were TBT-treated for 2 hrs or 4 hrs with 0.8 μ M TBT or vehicle alone (EtOH: 0.1%). Whole cell protein extracts (1×10^6 cells) were loaded on a 10% SDS-PAGE and immunoblotted with A) an anti-phospho-PKC δ antibody or B) an anti-EBP1 antibody. Anti-PKC δ and

anti-actin antibodies were used as loading controls. A) et B) These experiments are representative of three independent experiments.

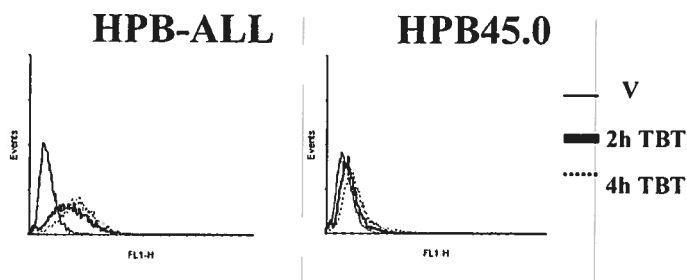
Figure 5: NF- κ B is active in CD45- cells. HPB-ALL (CD45+) and HPB45.0 (CD45-) cells were transiently transfected with the plasmid pNF- κ B-Luc using LipofectamineTM. After 48 hrs, cells were incubated for 2 hrs or 4 hrs in the presence of 0.8 μ M TBT or to vehicle. Cells were lysed and the luciferase activity was measured with a luminometer. The luciferase activities are means \pm S.E.M from at least three different experiments (***) $P < 0.001$).

Figure 6: No DNA fragmentation restoration in CD45- cells after inhibition of NF- κ B and kinases downstream of CD45 signalization. Both CD45+ and CD45- cell lines were exposed to selected inhibitors for 1 hr at 37°C and then TBT-treated or vehicle-treated for another 4 hrs. Cells were permeabilized, labeled with PI and analyzed by flow cytometry. These experiments are representative of three independent experiments.

A



B



C

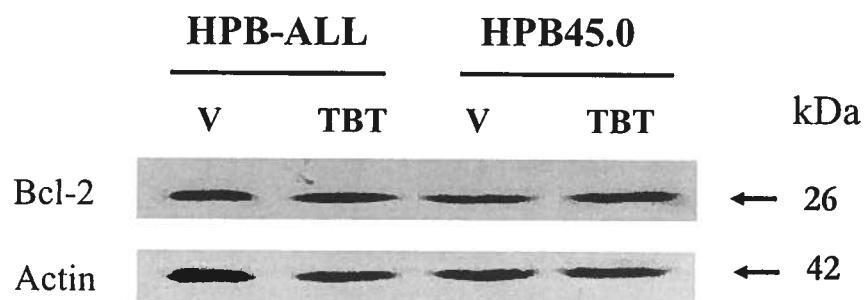


Figure 1

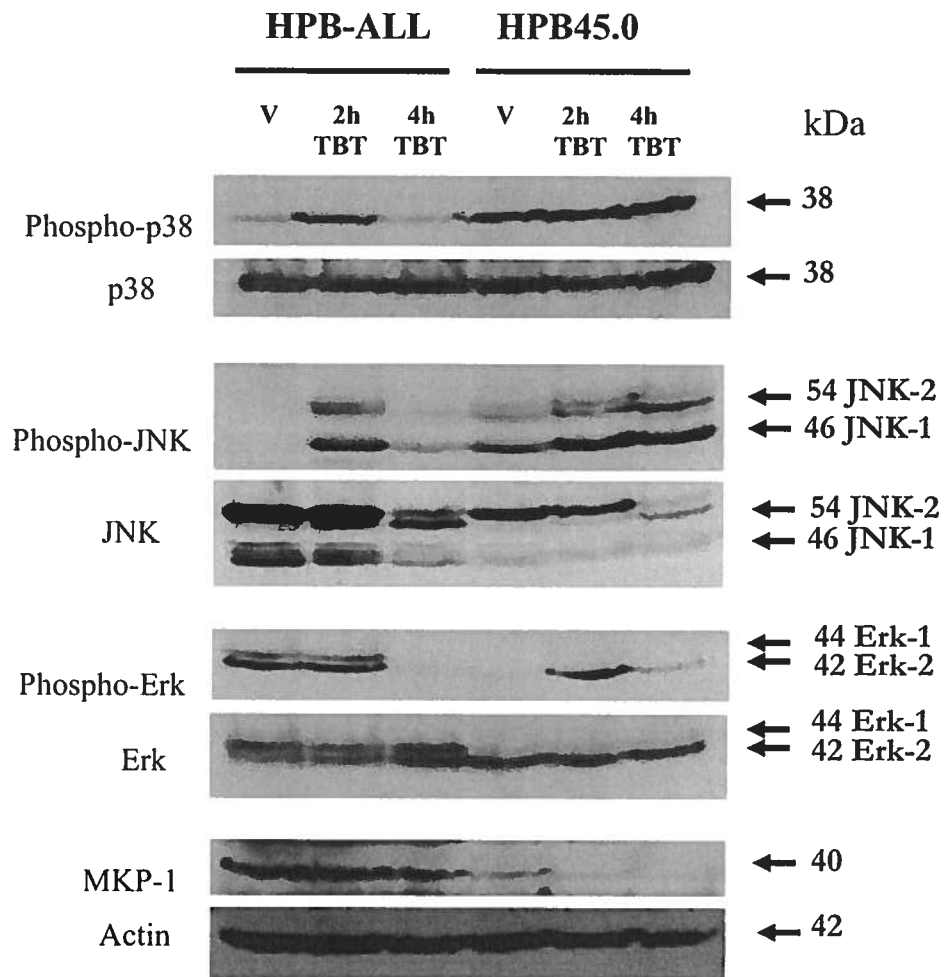


Figure 2

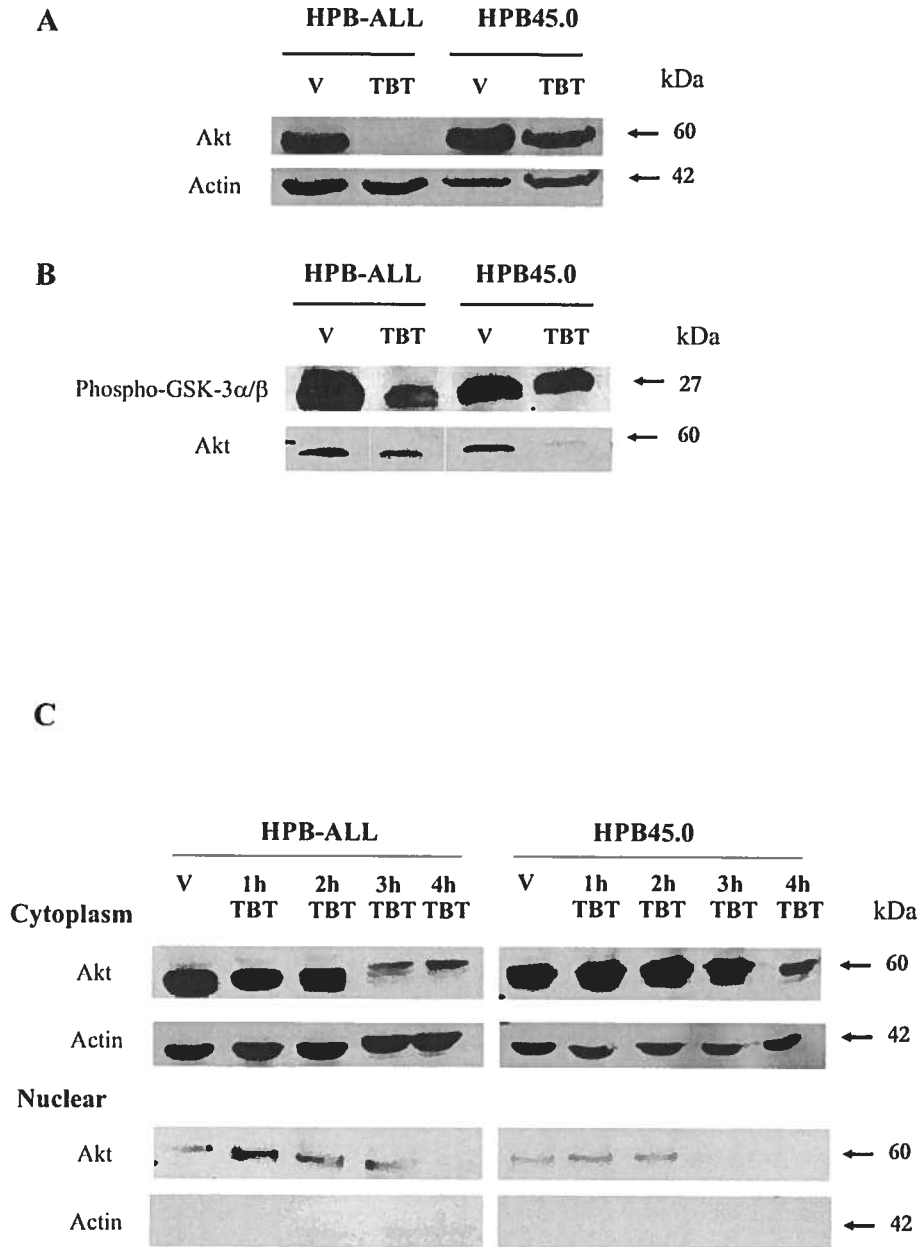
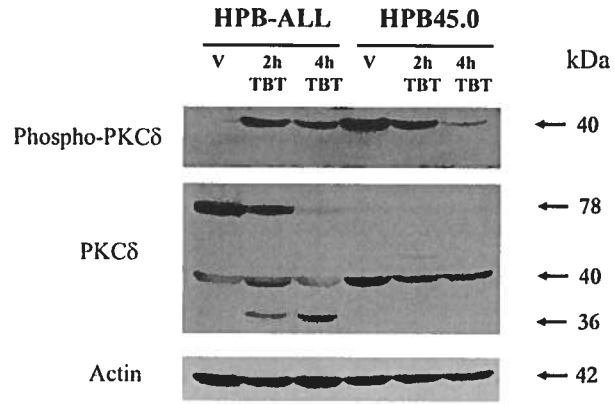


Figure 3

A



B

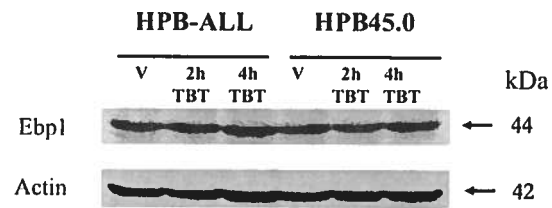


Figure 4

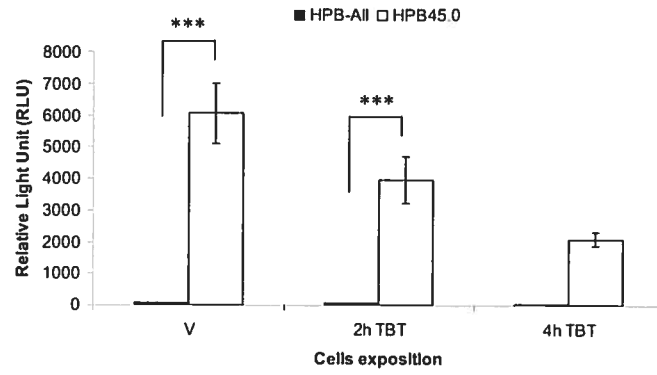
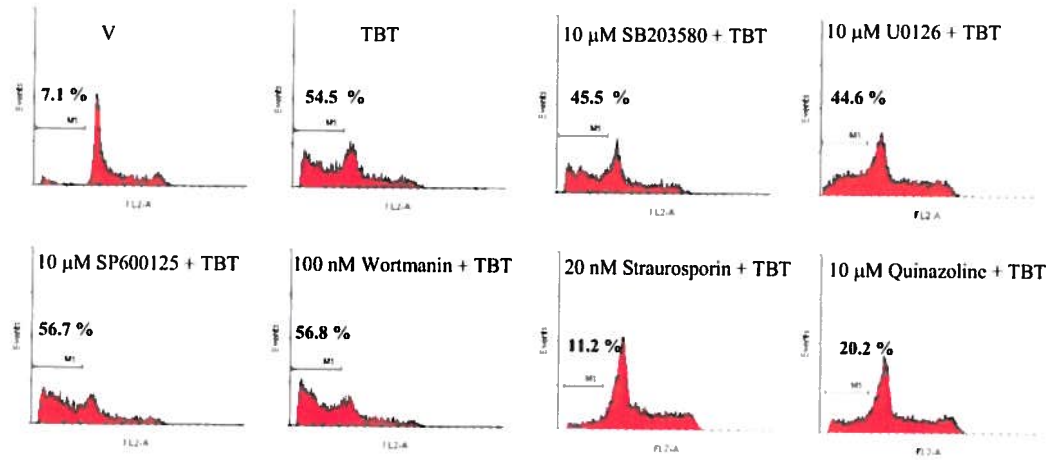


Figure 5

HPB-ALL



HPB45.0

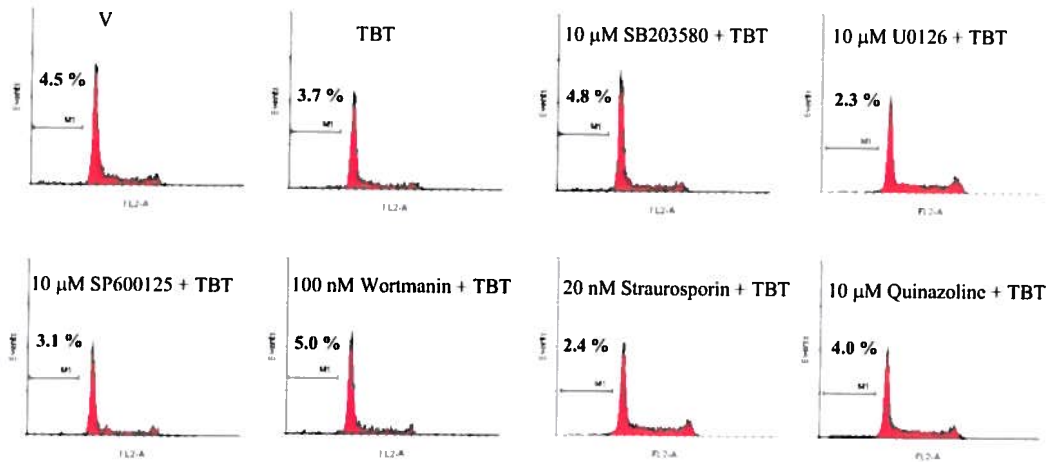


Figure 6

References

1. Cohen, J.J., Duke, R.C., Fadok, V.A., and Sellins, K.S. (1992) Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol*, **10**, 267-93.
2. Martelli, A.M., Zweyer, M., Ochs, R.L., Tazzari, P.L., Tabellini, G., Narducci, P., and Bortul, R. (2001) Nuclear apoptotic changes: an overview. *J Cell Biochem*, **82**, 634-46.
3. Hengartner, M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**, 770-6.
4. Fadeel, B., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (1999) Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun*, **266**, 699-717.
5. Cohen, J.J. (1993) Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract (Off Ed)*, **28**, 35-43.
6. Bohm, I. and Schild, H. (2003) Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol Imaging Biol*, **5**, 2-14.
7. Loeffler, M. and Kroemer, G. (2000) The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*, **256**, 19-26.
8. Ashe, P.C. and Berry, M.D. (2003) Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **27**, 199-214.
9. Adams, J.M. and Cory, S. (2001) Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci*, **26**, 61-6.

10. Danial, N.N. (2007) BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res*, **13**, 7254-63.
11. Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*, **256**, 12-8.
12. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, **391**, 43-50.
13. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, **89**, 175-84.
14. Widlak, P., Lanuszewska, J., Cary, R.B., and Garrard, W.T. (2003) Subunit structures and stoichiometries of human DNA fragmentation factor proteins before and after induction of apoptosis. *J Biol Chem*, **278**, 26915-22.
15. Lechardeur, D., Dougaparsad, S., Nemes, C., and Lukacs, G.L. (2005) Oligomerization state of the DNA fragmentation factor in normal and apoptotic cells. *J Biol Chem*, **280**, 40216-25.
16. Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, **391**, 96-9.

17. Liu, X., Zou, H., Widlak, P., Garrard, W., and Wang, X. (1999) Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J Biol Chem*, **274**, 13836-40.
18. Woo, E.J., Kim, Y.G., Kim, M.S., Han, W.D., Shin, S., Robinson, H., Park, S.Y., and Oh, B.H. (2004) Structural mechanism for inactivation and activation of CAD/DFF40 in the apoptotic pathway. *Mol Cell*, **14**, 531-9.
19. Sakahira, H. and Nagata, S. (2002) Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J Biol Chem*, **277**, 3364-70.
20. Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T., and Wang, X. (1998) The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8461-6.
21. Widlak, P., Li, P., Wang, X., and Garrard, W.T. (2000) Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. *J Biol Chem*, **275**, 8226-32.
22. Lu, C., Zhu, F., Cho, Y.Y., Tang, F., Zykova, T., Ma, W.Y., Bode, A.M., and Dong, Z. (2006) Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Mol Cell*, **23**, 121-32.

23. Ahn, J.Y., Liu, X., Cheng, D., Peng, J., Chan, P.K., Wade, P.A., and Ye, K. (2005) Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD. *Mol Cell*, **18**, 435-45.
24. Ahn, J.Y., Liu, X., Liu, Z., Pereira, L., Cheng, D., Peng, J., Wade, P.A., Hamburger, A.W., and Ye, K. (2006) Nuclear Akt associates with PKC-phosphorylated Ebp1, preventing DNA fragmentation by inhibition of caspase-activated DNase. *EMBO J*, **25**, 2083-95.
25. Cho, S.G., Kim, J.W., Lee, Y.H., Hwang, H.S., Kim, M.S., Ryoo, K., Kim, M.J., Noh, K.T., Kim, E.K., Cho, J.H., Yoon, K.W., Cho, E.G., Park, H.S., Chi, S.W., Lee, M.J., Kang, S.S., Ichijo, H., and Choi, E.J. (2003) Identification of a novel antiapoptotic protein that antagonizes ASK1 and CAD activities. *J Cell Biol*, **163**, 71-81.
26. Widlak, P. and Garrard, W.T. (2009) Roles of the major apoptotic nuclease-DNA fragmentation factor-in biology and disease. *Cell Mol Life Sci*, **66**, 263-74.
27. Hanus, J., Kalinowska-Herok, M., and Widlak, P. (2008) The major apoptotic endonuclease DFF40/CAD is a deoxyribose-specific and double-strand-specific enzyme. *Apoptosis*, **13**, 377-82.
28. Widlak, P. and Garrard, W.T. (2001) Ionic and cofactor requirements for the activity of the apoptotic endonuclease DFF40/CAD. *Mol Cell Biochem*, **218**, 125-30.

29. Altin, J.G. and Sloan, E.K. (1997) The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol*, **75**, 430-45.
30. Trowbridge, I.S. and Thomas, M.L. (1994) CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol*, **12**, 85-116.
31. Penninger, J.M., Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., and Oliveira-dos-Santos, A.J. (2001) CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat Immunol*, **2**, 389-96.
32. Song, J., Lei, F.T., Xiong, X., and Haque, R. (2008) Intracellular signals of T cell costimulation. *Cell Mol Immunol*, **5**, 239-47.
33. Gomez, J., Gonzalez, A., Martinez-A, C., and Rebollo, A. (1998) IL-2-induced cellular events. *Crit Rev Immunol*, **18**, 185-220.
34. Carnero, A., Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Link, W., and Leal, J.F. (2008) The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets*, **8**, 187-98.
35. Junttila, M.R., Li, S.P., and Westermarck, J. (2008) Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*, **22**, 954-65.
36. Reyland, M.E. (2007) Protein kinase Cdelta and apoptosis. *Biochem Soc Trans*, **35**, 1001-4.

37. Lesage, S., Steff, A.M., Philippoussis, F., Page, M., Trop, S., Mateo, V., and Hugo, P. (1997) CD4⁺ CD8⁺ thymocytes are preferentially induced to die following CD45 cross-linking, through a novel apoptotic pathway. *J Immunol*, **159**, 4762-71.
38. Klaus, S.J., Sidorenko, S.P., and Clark, E.A. (1996) CD45 ligation induces programmed cell death in T and B lymphocytes. *J Immunol*, **156**, 2743-53.
39. Ogimoto, M., Katagiri, T., Mashima, K., Hasegawa, K., Mizuno, K., and Yakura, H. (1994) Negative regulation of apoptotic death in immature B cells by CD45. *Int Immunol*, **6**, 647-54.
40. Blaylock, M.G., Sexton, D.W., and Walsh, G.M. (1999) Ligation of CD45 and the isoforms CD45RA and CD45RB accelerates the rate of constitutive apoptosis in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, **104**, 1244-50.
41. Dupere-Minier, G., Hamelin, C., Desharnais, P., and Bernier, J. (2004) Apoptotic volume decrease, pH acidification and chloride channel activation during apoptosis requires CD45 expression in HPB-ALL T cells. *Apoptosis*, **9**, 543-51.
42. Desharnais, P., Dupere-Minier, G., Hamelin, C., Devine, P., and Bernier, J. (2008) Involvement of CD45 in DNA fragmentation in apoptosis induced by mitochondrial perturbing agents. *Apoptosis*, **13**, 197-212.
43. Colombo, M., Hamelin, C., Kouassi, E., Fournier, M., and Bernier, J. (2004) Differential effects of mercury, lead, and cadmium on IL-2 production by Jurkat T cells. *Clin Immunol*, **111**, 311-22.

44. Tsujimoto, Y. (1997) Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death Differ*, **4**, 429-34.
45. Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kuhnle, S., and Nicotera, P. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*, **185**, 1481-6.
46. Stridh, H., Fava, E., Single, B., Nicotera, P., Orrenius, S., and Leist, M. (1999) Tributyltin-induced apoptosis requires glycolytic adenosine trisphosphate production. *Chem Res Toxicol*, **12**, 874-82.
47. Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., and Sheu, S.S. (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*, **287**, C817-33.
48. Simon, H.U., Haj-Yehia, A., and Levi-Schaffer, F. (2000) Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, **5**, 415-8.
49. Nakatsu, Y., Kotake, Y., and Ohta, S. (2007) Concentration dependence of the mechanisms of tributyltin-induced apoptosis. *Toxicol Sci*, **97**, 438-47.
50. Gennari, A., Viviani, B., Galli, C.L., Marinovich, M., Pieters, R., and Corsini, E. (2000) Organotins induce apoptosis by disturbance of calcium and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of caspases in rat thymocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, **169**, 185-90.

51. Gross, A. (2001) BCL-2 proteins: regulators of the mitochondrial apoptotic program. *IUBMB Life*, **52**, 231-6.
52. Nunez, G., London, L., Hockenbery, D., Alexander, M., McKearn, J.P., and Korsmeyer, S.J. (1990) Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol*, **144**, 3602-10.
53. Strasser, A., Harris, A.W., and Cory, S. (1991) bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell*, **67**, 889-99.
54. Miyashita, T. and Reed, J.C. (1993) Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood*, **81**, 151-7.
55. Li, D., Ueta, E., Kimura, T., Yamamoto, T., and Osaki, T. (2004) Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer Sci*, **95**, 644-50.
56. Gupta, A., Rosenberger, S.F., and Bowden, G.T. (1999) Increased ROS levels contribute to elevated transcription factor and MAP kinase activities in malignantly progressed mouse keratinocyte cell lines. *Carcinogenesis*, **20**, 2063-73.
57. Ruiz-Ramos, R., Cebrian, M.E., and Garrido, E. (2005) Benzoquinone activates the ERK/MAPK signaling pathway via ROS production in HL-60 cells. *Toxicology*, **209**, 279-87.

58. Cowan, K.J. and Storey, K.B. (2003) Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol*, **206**, 1107-15.
59. Chang, L. and Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37-40.
60. Boutros, T., Chevet, E., and Metrakos, P. (2008) Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev*, **60**, 261-310.
61. Altomare, D.A. and Testa, J.R. (2005) Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*, **24**, 7455-64.
62. Jahani-Asl, A., Basak, A., and Tsang, B.K. (2007) Caspase-3-mediated cleavage of Akt: involvement of non-consensus sites and influence of phosphorylation. *FEBS Lett*, **581**, 2883-8.
63. Andjelkovic, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M., and Hemmings, B.A. (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem*, **272**, 31515-24.
64. Hu, Y., Yao, J., Liu, Z., Liu, X., Fu, H., and Ye, K. (2005) Akt phosphorylates acinus and inhibits its proteolytic cleavage, preventing chromatin condensation. *EMBO J*, **24**, 3543-54.

65. Lee, S.B., Xuan Nguyen, T.L., Choi, J.W., Lee, K.H., Cho, S.W., Liu, Z., Ye, K., Bae, S.S., and Ahn, J.Y. (2008) Nuclear Akt interacts with B23/NPM and protects it from proteolytic cleavage, enhancing cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 16584-9.
66. Musashi, M., Ota, S., and Shiroshita, N. (2000) The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Int J Hematol*, **72**, 12-9.
67. Zhang, Y., Woodford, N., Xia, X., and Hamburger, A.W. (2003) Repression of E2F1-mediated transcription by the ErbB3 binding protein Ebp1 involves histone deacetylases. *Nucleic Acids Res*, **31**, 2168-77.
68. Liu, Z., Liu, X., Nakayama, K.I., Nakayama, K., and Ye, K. (2007) Protein kinase C-delta phosphorylates Ebp1 and prevents its proteolytic degradation, enhancing cell survival. *J Neurochem*, **100**, 1278-88.
69. Baur, A., Garber, S., and Peterlin, B.M. (1994) Effects of CD45 on NF-kappa B. Implications for replication of HIV-1. *J Immunol*, **152**, 976-83.
70. Ward, S.G., Parry, R.V., Matthews, J., and O'Neill, L. (1997) A p38 MAP kinase inhibitor SB203580 inhibits CD28-dependent T cell proliferation and IL-2 production. *Biochem Soc Trans*, **25**, 304S.
71. Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feeser, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., Copeland, R.A., Magolda, R.L., Scherle, P.A., and Trzaskos, J.M. (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*, **273**, 18623-32.

72. Bennett, B.L., Sasaki, D.T., Murray, B.W., O'Leary, E.C., Sakata, S.T., Xu, W., Leisten, J.C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S.S., Manning, A.M., and Anderson, D.W. (2001) SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13681-6.
73. Powis, G., Bonjouklian, R., Berggren, M.M., Gallegos, A., Abraham, R., Ashendel, C., Zalkow, L., Matter, W.F., Dodge, J., Grindey, G., and et, a.l. (1994) Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res*, **54**, 2419-23.
74. Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., and Tomita, F. (1986) Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **135**, 397-402.
75. Tobe, M., Isobe, Y., Tomizawa, H., Nagasaki, T., Takahashi, H., Fukazawa, T., and Hayashi, H. (2003) Discovery of quinazolines as a novel structural class of potent inhibitors of NF-kappa B activation. *Bioorg Med Chem*, **11**, 383-91.
76. de la Taille, A., Chen, M.W., Burchardt, M., Chopin, D.K., and Buttyan, R. (1999) Apoptotic conversion: evidence for exchange of genetic information between prostate cancer cells mediated by apoptosis. *Cancer Res*, **59**, 5461-3.
77. Zhang, M., Li, Y., Zhang, H., and Xue, S. (2001) BAPTA blocks DNA fragmentation and chromatin condensation downstream of caspase-3 and DFF activation in HT-induced apoptosis in HL-60 cells. *Apoptosis*, **6**, 291-7.

78. Iguchi, K., Usui, S., Ishida, R., and Hirano, K. (2002) Imidazole-induced cell death, associated with intracellular acidification, caspase-3 activation, DFF-45 cleavage, but not oligonucleosomal DNA fragmentation. *Apoptosis*, **7**, 519-25.
79. Iguchi, K., Hirano, K., and Ishida, R. (2002) Activation of caspase-3, proteolytic cleavage of DFF and no oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic Molt-4 cells. *J Biochem*, **131**, 469-75.
80. Rasola, A., Farahi Far, D., Hofman, P., and Rossi, B. (1999) Lack of internucleosomal DNA fragmentation is related to Cl(-) efflux impairment in hematopoietic cell apoptosis. *FASEB J*, **13**, 1711-23.
81. Majeti, R., Bilwes, A.M., Noel, J.P., Hunter, T., and Weiss, A. (1998) Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge. *Science*, **279**, 88-91.
82. Desai, D.M., Sap, J., Schlessinger, J., and Weiss, A. (1993) Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase. *Cell*, **73**, 541-54.
83. Bilwes, A.M., den Hertog, J., Hunter, T., and Noel, J.P. (1996) Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization. *Nature*, **382**, 555-9.
84. Majeti, R., Xu, Z., Parslow, T.G., Olson, J.L., Daikh, D.I., Killeen, N., and Weiss, A. (2000) An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity. *Cell*, **103**, 1059-70.

85. Fleury, C., Mignotte, B., and Vayssiere, J.L. (2002) Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, **84**, 131-41.
86. Morita-Fujimura, Y., Fujimura, M., Gasche, Y., Copin, J.C., and Chan, P.H. (2000) Overexpression of copper and zinc superoxide dismutase in transgenic mice prevents the induction and activation of matrix metalloproteinases after cold injury-induced brain trauma. *J Cereb Blood Flow Metab*, **20**, 130-8.
87. Sidoti-de Fraisse, C., Rincheval, V., Risler, Y., Mignotte, B., and Vayssiere, J.L. (1998) TNF-alpha activates at least two apoptotic signaling cascades. *Oncogene*, **17**, 1639-51.
88. Steinman, H.M. (1995) The Bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant. *J Biol Chem*, **270**, 3487-90.
89. Lee, I., Salomon, A.R., Yu, K., Doan, J.W., Grossman, L.I., and Huttemann, M. (2006) New prospects for an old enzyme: mammalian cytochrome c is tyrosine-phosphorylated in vivo. *Biochemistry*, **45**, 9121-8.
90. Yu, H., Lee, I., Salomon, A.R., Yu, K., and Huttemann, M. (2008) Mammalian liver cytochrome c is tyrosine-48 phosphorylated in vivo, inhibiting mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta*, **1777**, 1066-71.
91. Jia, Y.T., Wei, W., Ma, B., Xu, Y., Liu, W.J., Wang, Y., Lv, K.Y., Tang, H.T., Wei, D., and Xia, Z.F. (2007) Activation of p38 MAPK by reactive oxygen species is essential in a rat model of stress-induced gastric mucosal injury. *J Immunol*, **179**, 7808-19.

92. Wu, H.W., Li, H.F., Wu, X.Y., Zhao, J., and Guo, J. (2008) Reactive oxygen species mediate ERK activation through different Raf-1-dependent signaling pathways following cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, **432**, 83-7.
93. Yoshizumi, M., Abe, J., Haendeler, J., Huang, Q., and Berk, B.C. (2000) Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. *J Biol Chem*, **275**, 11706-12.
94. Ushio-Fukai, M., Alexander, R.W., Akers, M., Yin, Q., Fujio, Y., Walsh, K., and Griending, K.K. (1999) Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **274**, 22699-704.
95. Schreck, R., Rieber, P., and Baeuerle, P.A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J*, **10**, 2247-58.
96. D'Oro, U. and Ashwell, J.D. (1999) Cutting edge: the CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes. *J Immunol*, **162**, 1879-83.
97. Chen, X., Lan, X., Mo, S., Qin, J., Li, W., Liu, P., Han, Y., and Pi, R. (2009) p38 and ERK, but not JNK, are involved in copper-induced apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, **379**, 944-8.
98. Ivanov, V.N. and Ronai, Z. (2000) p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF-kappaB activity and Fas expression. *Oncogene*, **19**, 3003-12.

99. Chathoth, S., Thayyullathil, F., Hago, A., Shahin, A., Patel, M., and Galadari, S. (2009) UVC-Induced Apoptosis in Dubca Cells is Independent of JNK Activation and p53(Ser-15) phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*.
100. Appierto, V., Tiberio, P., Villani, M.G., Cavadini, E., and Formelli, F. (2009) PLAB induction in fenretinide-induced apoptosis of ovarian cancer cells occurs via a ROS-dependent mechanism involving ER stress and JNK activation. *Carcinogenesis*.
101. Tan, H., Ling, H., He, J., Yi, L., Zhou, J., Lin, M., and Su, Q. (2008) Inhibition of ERK and activation of p38 are involved in diallyl disulfide induced apoptosis of leukemia HL-60 cells. *Arch Pharm Res*, **31**, 786-93.
102. Matassa, A.A., Carpenter, L., Biden, T.J., Humphries, M.J., and Reyland, M.E. (2001) PKCdelta is required for mitochondrial-dependent apoptosis in salivary epithelial cells. *J Biol Chem*, **276**, 29719-28.
103. Barkett, M. and Gilmore, T.D. (1999) Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, **18**, 6910-24.
104. Rayet, B. and Gelinis, C. (1999) Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, **18**, 6938-47.
105. Ratei, R., Sperling, C., Karawajew, L., Schott, G., Schrappe, M., Harbott, J., Riehm, H., and Ludwig, W.D. (1998) Immunophenotype and clinical characteristics of CD45-negative and CD45-positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol*, **77**, 107-14.

106. Ozdemirli, M., Mankin, H.J., Aisenberg, A.C., and Harris, N.L. (1996) Hodgkin's disease presenting as a solitary bone tumor. A report of four cases and review of the literature. *Cancer*, **77**, 79-88.
107. Ishikawa, H., Mahmoud, M.S., Fujii, R., Abroun, S., and Kawano, M.M. (2000) Proliferation of immature myeloma cells by interleukin-6 is associated with CD45 expression in human multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*, **39** , 51-5.
108. Kumar, S., Rajkumar, S.V., Kimlinger, T., Greipp, P.R., and Witzig, T.E. (2005) CD45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: clinical and biological correlations. *Leukemia*, **19**, 1466-70.
109. Moreau, P., Robillard, N., Avet-Loiseau, H., Pineau, D., Morineau, N., Milpied, N., Harousseau, J.L., and Bataille, R. (2004) Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma. *Haematologica*, **89**, 547-51.

1.3 ARTICLE III

Objectifs spécifiques de l'article III

À l'invitation de la revue *Apoptosis* nous avons rédigé une revue sur l'implication du CD45 dans l'apoptose. Les objectifs spécifiques étaient :

- Décrire la structure, la régulation ainsi que les principales fonctions du CD45.
- Exposer les résultats de toutes les différentes études rapportant un rôle pour le CD45 dans l'apoptose.

Ce manuscrit a été accepté avec corrections mineures dans la revue *Apoptosis*.

Contributions à l'article

La rédaction de l'article a été accomplie par moi-même avec l'aide de Philippe Desharnais et le Dr Jacques Bernier.

Résumé français

Le CD45 est une molécule transmembranaire détenant une activité phosphatase, exprimée chez toutes les cellules hématopoïétiques nucléées et jouant un rôle majeur chez les cellules du système immunitaire. Le CD45 est une protéine tyrosine phosphatase essentielle pour la transduction de signaux suite à une stimulation antigénique en régulant des membres de la famille Src qui initient la signalisation du TCR. Un nouveau rôle commence à être attribué au CD45 en tant que régulateur de l'apoptose. La liaison de la portion extracellulaire du CD45 par des anticorps monoclonaux et par la galectine-1, un ligand naturel du CD45, peut induire l'apoptose chez les cellules T et B. Le CD45 est également impliqué dans la régulation de l'apoptose nucléaire suite à l'induction de l'apoptose par des agents perturbant la mitochondrie. De plus, le CD45 est impliqué dans l'apoptose induite par le VIH. Des perturbations de la molécule CD45 sont impliquées dans plusieurs maladies comme dans le syndrome de SCID, le syndrome d'immuno-déficience acquise (SIDA), chez des lymphomes et ainsi que chez des myélomes multiples. La compréhension du mécanisme de régulation de l'apoptose par le CD45 serait très utile pour le traitement de ces maladies.

Involvement of Tyrosine Phosphatase CD45 in Apoptosis

Review

Geneviève Dupéré-Minier¹, Philippe Desharnais¹ and Jacques Bernier¹

¹INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7

Corresponding author:

Jacques Bernier
jacques.bernier@iaf.inrs.ca
450-687-5010 ext 8813
Fax: 450-686-5510

Abstract

CD45 is a transmembrane molecule with phosphatase activity expressed in all nucleated haematopoietic cells and plays a major role in immune cells. It is a protein tyrosine phosphatase that is essential for antigen-receptor-mediated signal transduction by regulating Src family members that initiate TCR signaling. CD45 is being attributed a new emerging role as an apoptosis regulator. Cross-linking of the extracellular portion of the CD45 by monoclonal antibodies and by galectin-1, can induce apoptosis in T and B cells. Interestingly, this phosphatase has also been involved in nuclear apoptosis induced by mitochondrial perturbing agents. Furthermore, it is involved in apoptosis induced by HIV-1. CD45 defect is implicated in various diseases such as severe-combined immunodeficiency disease (SCID), acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), lymphoma and multiple myelomas. The understanding of the mechanisms by which CD45 regulates apoptosis would be very useful in disease treatment.

Keywords

CD45 - Tyrosine phosphatase - Apoptosis - Nuclear apoptosis - DNA fragmentation

DFF40.

Introduction

CD45, originally called *leukocyte common antigen*, is a type 1 transmembrane molecule expressed specifically in all nucleated haematopoietic cells and their precursors. It was identified as the first prototypic transmembrane protein tyrosine phosphatase (PTP) [1]. It comprises up to 10% of total protein in cell surface area in T and B cells and is an essential regulator of signal transduction pathways in immune cells [2,3]. The main role attributed to CD45 is to regulate the signaling thresholds of receptors expressed on immune cells, but an important role in the control of cell survival and death is emerging [4,5].

CD45 structure and isoforms

CD45 is a type 1 transmembrane protein consisting of an extracellular domain, a single transmembrane domain and a large cytoplasmic region. The intracellular portion, which is highly conserved among mammalian species, is composed of two duplicated PTP domains, D1 and D2, and a C-terminal tail [3]. Only the proximal domain (D1) has phosphatase activity but both domains are required for normal activity of the enzyme [6]. The D2 domain could regulate D1 phosphatase activity, and it has been suggested that D2 binds to the cytoskeleton through the fodrin protein thereby allowing substrates to reach the active site of the D1 domain [7,8]. Multiple isoforms of CD45 exist as a result of the alternative RNA splicing of the exons 4, 5 and 6 which code for the various extracellular N-terminal peptide segments (designated A, B and C) (Figure 1) [2]. Thus, it can generate up to eight CD45 isoforms, five of which are expressed at significant levels in

human T cells [9]. Studies in mRNA level have provided evidence for alternative splicing of exons 7, 8 and 10 but corresponding protein expression for these isoforms is lacking [10]. The three alternatively spliced exons encode multiple sites of O-linked glycosylation. The remaining extracellular domain is heavily N-glycosylated and contains a cysteine-rich region and three fibronectin type III domains [11]. As the variable expression of different CD45 exons greatly affects its extracellular structure, the isoforms' molecular weight range from 180 kDa (RO) to 240 kDa (RABC), depending on the glycosylation state of the extracellular domain [3]. Indeed, carbohydrates varying quantitatively and qualitatively depending on the cell type and on the state of activation and differentiation of the haematopoietic cells contribute to one third of the total molecular weight of mature CD45 [2,12]. The expression of different CD45 isoforms is regulated during haematopoietic cell development and in different cell lineages [11]. Different isoforms influence biological function and alter biochemical-signaling events [13]. For example, naive T cells express the larger CD45RA isoform while activated and memory T cells carry the smaller CD45RO isoform [14]. It has been shown that low molecular weight isoforms colocalize with components of the T cell receptor (TCR) [15]. Moreover, it has been suggested that CD45RABC is not able to generate CD45/CD3 proximal interaction nor generate cytotoxic T cell response, due to its size and charge distribution [16,17]. The size and the relative glycosylation of the different isoforms can influence the CD45 phosphatase activity and the biological response of the cell [5]. Thus, differential expression of the CD45 isoforms can influence downstream signaling events, but much remains to be known about the regulation and the biological function of each individual isoform.

Role in the immune system cells

CD45 is a positive regulator of the TCR and B cell receptor (BCR) signaling. Indeed, CD45 is essential for signal transduction after an antigenic stimulation. The demonstration of the importance of CD45 expression in lymphocyte activation came from studies showing that non-transformed CD45 deficient T lymphocytes were unable to proliferate and produce cytokines in response to TCR or CD3 stimulation [18,19]. Furthermore, the generation of CD45-deficient mice showed that CD45 also had a role to play in immune system development [20,21]. In mice deficient for all CD45 isoforms, impairment in both T and B cell activation is observed. Moreover, T lymphocyte development is blocked at two levels. The differentiation of CD4-CD8- thymocytes into CD4+CD8+ thymocytes is reduced by twofold due to an increase of basal apoptosis. Subsequent maturation of CD4+CD8+ thymocytes into CD4+CD8-/CD4-CD8+ T cells is reduced four to fivefold and the elimination of auto-reactive thymocytes is also compromised [3,22]. CD45-deficient T cells are defective in cell signaling in many ways such as: phosphorylation of tyrosine residues, phosphoinositide metabolism, protein kinase C activation, calcium mobilization and IL-2 production [3,23-25]. Patients deficient for CD45 expression suffer from a severe combined immunodeficiency (SCID) also observed in CD45-deficient mice [21,26-29]. SCID is a disease characterized by a defect in T and B cell function and development, dramatic lymphopenia and deficiency in humoral and cell-mediated immunity.

The activation of lymphocytes during the immune response leads to protein synthesis, gene expression, changes in cell morphology and cell proliferation. The signaling events leading to the activation of T and B lymphocytes after antigen recognition are mediated by a complex process consisting of interaction of the TCR complex with accessory molecules such as CD4 or CD8, proteins kinases and tyrosines phosphatases. CD45 is involved in lymphocytes activation, particularly in the regulation of Src family members, like p56lck and p59fyn. The proteins tyrosine kinases p56lck and p59fyn are responsible for the phosphorylation of the CD3 chains in T lymphocytes, which serves as a molecular anchor for the initiation of biochemical activation signals [3,30,31]. In CD45-deficient T lymphocytes, these enzymes are hyperphosphorylated and their activity is increased two to fourfold [30]. An important role of CD45 in the regulation of this process is to dephosphorylate the negative regulation site of these kinases in order to confer to them an unfolded and active form. The Src family of kinases have been identified as the primary molecular targets of CD45 in lymphocytes [2]. The expression of a constitutively activated form of p56lck, caused by a mutation in the negative regulatory site (LckF505), restores a normal T-cell development in CD45-deficient mice [32]. Besides the control of Src kinases activity, CD45 is important for antigen receptor-induced tyrosine phosphorylation, PIP2 hydrolysis, Ras and Vav-1 activation, Ca²⁺ mobilization, integrin-mediated T cell adhesion, development, proliferation and cytokine production [2,31]. In some cases, CD45's activity can have an inhibitory effect in signaling. For instance, CD45 can interact and dephosphorylate tyrosines on TCR ζ chain [33]. As tyrosines' phosphorylation on TCR ζ chain recruits the tyrosine kinases Syk for signal amplification, the CD45 diminishes this process. It was also suggested that CD45 can

directly or indirectly inactivate ZAP-70 by dephosphorylating the tyrosine residues [34]. CD45 was also shown to be a Janus kinase (Jak) phosphatase that negatively regulates cytokine receptor signaling [35]. CD45 directly dephosphorylates critical and conserved tyrosine residues located in the activation loop of all four members of the Jak family, Jak1, Jak2, Jak3 and Tyk2, which results in a decrease of Jak activity involved in the differentiation, proliferation and antiviral immunity of haematopoietic cells [1]. An unexpected role for the intracellular domain of CD45 was recently reported. Indeed, in human monocytes and granulocytes, CD45 is sequentially cleaved by serine/metalloproteinases and gamma-secretases during their activation by fungal stimuli or phorbol 12-myristate 13-acetate [36]. CD45 cleavages release a 95-kDa fragment of the CD45 cytoplasmic tail. The presence of a counter-receptor on pre-activated T cells and the inhibition of their proliferation in the presence of this fragment suggest that the release of CD45 intracellular domain fragments from human phagocytes could function as intercellular regulators of T-cell activation [36].

Regulation of CD45 activity

CD45 activity is regulated by phosphorylation and dephosphorylation that can modulate the phosphatase activity [37-39]. As phosphorylation is induced after stimulation of the cells, it could be a mechanism to down-regulate the activation of the cell [37]. CD45 has four serine residues in the acidic insert in the D2 domain that could be phosphorylated by CK2 and thereby modulate its activity [40,41]. Further investigation is required to elucidate the regulation of CD45 activity by phosphorylation and to identify potential regulators. The binding of CD45 to the CD45-associated protein (CD45-AP) can modify

its interaction with other proteins [42]. CD45-AP is highly expressed in T and B cells and could play an adaptive role in coordinating CD45 interaction with protein tyrosine kinases such as ZAP-70 and p56lck. It has been suggested that CD45 activity is also regulated by dimerization that inhibits the phosphatase activity [14,43-47]. Interaction with its ligands may induce CD45 dimerization. This dimerization occurs through symmetrical interactions between the putative inhibitory structural wedge in the juxtamembrane region of one monomer and the catalytic site in the cytoplasmic domain of its partner. This interaction results in blocking the catalytic site and therefore inhibits the phosphatase activity. Moreover, it has been determined that the extracellular region of CD45 plays a role in the regulation of its activity. Spontaneous and differential homodimerization by the sialylation and O-glycosylation of alternatively spliced exons in the extracellular domain are involved in CD45 activity regulation [48]. Indeed, CD45 homodimerization varies according to the expressed CD45 isoforms. Glycosylation of CD45 varies according to the lineage and differentiation stage of the cell [49]. Various CD45 isoforms could homodimerize in primary and transfected T cells but the RO isoform (which undergoes the least extracellular sialylation and O-glycosylation) dimerizes more rapidly and efficiently than the larger isoforms. The dimerization of CD45 results in a decrease in signaling via the TCR. Birkeland *et al.* [50] suggested that activated T cells switch from RA to RO isoform several days after stimulation and the preferential homodimerization of the RO subsets may reduce the available CD45 activity thereby contributing to downregulation of the primary T cell response [48]. Although the CD45 dimerization model is considered in several studies there is no proof yet that dimerization really occurs *in vivo*. Furthermore, the crystal structure of CD45 does not

support such dimerization model [51]. Besides the dimerization model, glycosylation and sialylation alterations also regulate CD45 activity by affecting the recognition of CD45 from various binding partners which influences downstream signaling pathways [5].

CD45 implication in apoptosis

Apoptosis is an evolutionary biological process involved in the normal turnover of tissues, essential for the removal of infected, old, non-necessary or damaged cells. Defects in this process are associated with numerous diseases. Apoptosis is characterized by cell shrinkage, intracellular acidification, formation of apoptotic bodies, phosphatidylserine externalisation, chromatin condensation, DNA degradation into high molecular weight and oligonucleosomal fragments [52,53]. Apoptosis can be induced by physiological and pathophysiological stimuli such as death receptor ligands, cytotoxic drugs, irradiation and viruses [54]. Apoptosis induction activates a proteolytic cascade involving caspases, which dismantle the apoptotic cell. One specific hallmark of apoptosis is the internucleosomal DNA fragmentation that produces low molecular weight fragments of 180 to 200 base pairs. The endonuclease DNA fragmentation factor-40 (DFF40) is the main enzyme responsible for this fragmentation. DFF40 is activated when caspase-3 cleaves the DNA fragmentation factor-45 (DFF45), the inhibitory subunit of DFF40, thus releasing the enzyme [55]. In this review, we will discuss the involvement of CD45 in apoptosis regulation.

1) Monoclonal antibodies-mediated CD45 apoptosis

It has been shown that the cross-linking of the extracellular portion of CD45 with monoclonal antibodies can induce apoptosis in T cells, B cells and eosinophils [56-59]. T and B cell lines are also sensitive to cell death mediated by CD45 ligation with insoluble monoclonal antibodies [59]. CD45-mediated cell death in T and B cells is morphologically characterized by distinct patterns of apoptosis such as nuclear condensation and membrane blebbing. Interestingly, the induction of apoptosis in T and B cells by anti-CD45 antibodies does not cause any internucleosomal DNA cleavage that is specific to apoptosis [57,59]. Cell death seems to be dependant on tyrosine kinases and phosphatases, as it is blocked by tyrosine kinases and phosphatase inhibitors. On the other hand, this process is independent of RNA or protein synthesis, as shown by the use of specific inhibitors [59].

Lesage *et al.* [57] have demonstrated that apoptosis can be induced in thymocytes following CD45 cross-linking. CD45 ligation of immature thymocytes by a monoclonal antibody led to the induction of cell death, characterized by a reduction in mitochondrial membrane potential, production of reactive oxygen species, loss of membrane asymmetry, exposure of phosphatidylserine residues, and incorporation of vital dyes. Contrary to most stimuli causing thymocyte death, CD45 cross-linking did not lead to DNA degradation. Cell death was not blocked by Bcl-2 over-expression or treatment with a caspase inhibitor. However, cell death was inhibited by the addition of scavengers of reactive oxygen species. The susceptibility to CD45-mediated death is acquired during the transition of early CD4-CD8-TCR- T cell precursors into CD4+ CD8+ TCR-

thymocytes, and is increased with further acquisition of surface TCR on these cells. Moreover, mature thymocytes were less sensitive to CD45 cross-linking than CD4⁺ CD8⁺ cells. It was suggested that during T cell development, CD45 ligation could induce the death of immature thymocytes that do not fulfill the requirements for positive selection [57].

The biochemical cascade related to apoptosis induction by monoclonal antibodies remains to be determined. Nevertheless, it has been determined that CD45-mediated cell death following extracellular cross-linking is independent of its intracellular phosphatase activity and its cytoplasmic domain [60]. Indeed, phosphatase dead mutant (C817S) or a mutant lacking most of the cytoplasmic region, including both phosphatase domains, are sensitive to CD45-mediated apoptosis. These results suggest a possible role for the extracellular and transmembrane domains in apoptosis induction [60]. Moreover, apoptosis induction through CD45 is detected in LPAP-deficient (lymphocyte phosphatase associated phosphoprotein, human homologue to CD45-AP) thymocytes, indicating that it is not required for CD45-mediated cell death. Whether the CD45-mediated apoptosis involves some sort of interaction between its extracellular domain and other cell surface molecules remains to be determined. However, the fact that CD45 becomes associated with the detergent's insoluble fraction after cross-linking indicates a possible association with the cytoskeleton and suggests a mechanism by which CD45 could be brought into contact with potential death substrates [59].

Blank *et al.* [61] investigated the role of CD45 in the signaling events in activated human lymphoblasts. For this purpose, the authors generated quiescent lymphoblasts from human blood and determined the effect of CD45 cross-linking with monoclonal antibody on the lymphoblast-induced proliferation by gamma cytokines. They observed that the CD45RO ligation leads to a reduction in the gamma C-cytokine-driven (IL,-2, IL-4, IL-7, IL-15) proliferation of the lymphoblasts. The authors concluded that this inhibition process was independent of apoptosis induction. However, the method used by Blank *et al.* [61] to assess apoptosis (analysis of sub diploid peak DNA fragmentation) is not suitable for the evaluation of CD45-mediated apoptosis by monoclonal antibody, which does not involve DNA fragmentation [57,59]. Thus, it is possible that the inhibition of proliferation observed by Blank *et al.* [61] was caused by apoptosis induction following CD45RO ligation. Hence, the fate of a cell can be seen as a balance between survival and death signals, the stronger signal eventually affecting the outcome. In this case, the proliferation signals added together with death signals (CD45RO mAbs) could create equilibrium between those signals, as they may act through the same targets. Interestingly, the cross-linking of CD45RO results in a decrease of STAT-3, STAT-5 and STAT-6 phosphorylation [61]. This effect may have been mediated through its action as a Jak phosphatase, through a CD45 substrate located in the vicinity of the cytokine receptors.

2) CD45 ligands induce apoptosis

Galectin-1 is a member of the evolutionarily conserved lectin family, galectins with affinity to β -galactoside containing glycoconjugates. It is involved in a variety of

processes including cell adhesion, cell growth regulation, immunomodulation, inflammation, apoptosis, embryogenesis, and cancer progression [62]. Galectin-1 is secreted and soluble, broadly distributed in the human body in the thymus, lymph nodes, spleen, prostate, lungs, placenta, endothelial cells and skin [63]. Galectin-1 specifically recognizes some galactose-containing oligosaccharides ligands, which can be found on a number of glycoproteins [64].

Galectin-1 induces the death of human and murine thymocytes and of activated human T cells through a Fas-, steroid-, and CD3- independent pathway [65-68]. It has been shown that placental galectin-1 and thymic epithelial cell galectin-1 is a ligand for the counterreceptor CD45 [66,69]. Several galectin-1 molecules can bind N-acetyllactosamine residues on oligosaccharides present on a single CD45 molecule [64]. In activated human T cells and T leukemic cell lines, the binding of galectin-1 induces apoptosis in a CD45-dependant fashion [66]. In Jurkat T cells, galectin-1 stimulates the cell surface expression of phosphatidylserine, which is an early indicator of apoptosis. In CD45+ Jurkat T cells, galectin-1 induces higher levels of phosphatidylserine compared to CD45- Jurkat cells [69]. Recently, Pang *et al.* [70] showed that fodrin degradation occurs during galectin-1-induced T cell death and that CD45 is essential for fodrin degradation to occur. In the absence of CD45, or if fodrin degradation is prevented, galectin-1-induced cell death is not accompanied by membrane blebbing and there is slower phagocytic uptake of T cells by macrophages [70]. Contrary to cell death mediated by monoclonal antibodies, the mechanisms of galectin-1-induced apoptosis have not been well studied, but are known to involve DNA fragmentation.

Galectin-1 also induces apoptosis of human thymocytes [67]. Among the different thymocyte subsets, CD4^{low}CD8^{low} were more sensitive to galectin-1-induced apoptosis, and it was suggested that galectin-1 could be implicated in the process of thymocyte maturation *in vivo* [57,67]. As immature CD4+CD8+ thymocytes mainly express low molecular weight CD45 isoforms [71], the level of glycosylation could therefore influence the CD45 binding to ligands such as galectin-1. In humans, CD45RO appears to be the main isoform interacting with galectin-1 [66,72]. Addition of galectin-1 to alloreactive lymphocytes results in significant apoptosis of CD45RO positive cells [73]. It can be speculated that steric hindrance on CD45 molecules regulates galectin-1 binding. Indeed, it has been shown that the presence of core 2-O glycans (added by the core 2 B-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase) on CD45RO isoform is essential to the cell death mediated by galectin-1 by facilitating the binding of galectin-1 and their colocalization on membrane blebs [65].

While CD45 expression is considered to be essential for apoptosis induction by galectin-1, it has been suggested that CD45 is not the receptor whereby the galectin-1 regulates apoptosis [74]. Indeed, galectin-1 can easily bind the cell surface of lymphocytes deficient for CD45 expression. Moreover, apoptosis induction by galectin-1 is similar in normal T cells and CD45-deficient T cells [74]. Hence, the regulation of apoptosis induction by galectin-1 remains unclear. The controversy of apoptosis induction by the binding of galectin-1 to the CD45 can be explained by the binding of galectin-1 to other cell surface molecules on immune cells. Indeed, it has been determined that galectin-1 is

able to bind to CD2, CD3, CD4, CD7 and CD43, but only CD45, CD7 and CD43 appear to participate directly in galectin-1-mediated apoptosis [66,75]. The involvement of CD7 and CD43 in the galectin-1-induced cell death process may explain the presence of DNA fragmentation in mature T lymphocytes compared to CD45-mediated apoptosis with monoclonal antibody. Galectin-1 ligation on T cells results in the redistribution of the bound molecules into segregated membrane microdomains [75]. CD45 colocalizes with CD3 in large islands in apoptotic blebs protruding from the cell surface, whereas CD7 and CD43 colocalize in small patches away from membrane blebs excluding externalized phosphatidylserine [75]. This segregation of CD45 from CD7 and CD43 could be regulated by cytoskeleton attachments as CD45 interacts with fodrin protein and CD43 through ezrin and moesin [5,8,76]. The fact that CD45 has a distinct spatial redistribution after galectin-1 binding compared to CD7 and CD43, may put it in contact with different effector molecules, therefore ending with different signaling pathways leading to cell death. It has been shown that the CD45 phosphatase activity is inhibited during apoptosis induced by galectin-1. Hence, the real implication of that tyrosine phosphatase is still uncertain [77,78].

Several other ligands have been shown to bind to CD45 through its extracellular domain. Galectin-3 and galectin-9 are other galectins that appear to be able to kill thymocytes. While cell death induced by galectin-9 does not require CD45 expression, CD45 seems to be implicated in galectin-3-induced cell death. Indeed, T cells deficient for CD45 expression were resistant to galectin-3-induced T cell death [79-81].

The transmembrane Ig superfamily protein CD22 expressed in B cells was identified as a potential CD45 ligand [82,83]. However, CD22 is a lectin-type protein that binds to N-glycans carrying sialic acid residues and therefore can bind to several molecules other than CD45. Moreover, it has been reported that CD45 can also physically associates with Thyl, CD2, CD4, LFAI, TCR complex and IFN receptor alpha chain on cell surface [1,84]. These interactions are still not well understood and do not appear to mediate cell death.

Recently, Ma *et al.* [85] reported that the lectin Jacalin induces apoptosis in B cells through glycosylation-dependent interaction with CD45. Jacalin is a Thomsen-Friedenreich antigen-specific lectin from jackfruit seeds that could be a major receptor for CD45 isoforms on B lymphocytes. Jacalin induces B cell apoptosis, resulting in calcium mobilization and calpain activation, suggesting that the calcium-calpain pathway may mediate the Jacalin-induced apoptosis. The apoptosis is blocked by a specific CD45 PTPase inhibitor, indicating that Jacalin induces B cell apoptosis through CD45 triggering [85]. In T cells, this lectin bound to CD45 caused an increase in T-cell activation in response to T-cell receptor ligation and CD28 co-stimulation [86]. Thus, Jacalin-induced apoptosis seems to be cell specific. The global scheme is that, *in vivo*, complex interactions of CD45 with its ligands seems to happen, depending on many factors such as isoforms expression, cell type and differentiation state.

3) Involvement of CD45 in the extrinsic death receptor pathway

The importance of tyrosine phosphorylation events in the apoptotic signaling process following triggering of the Fas receptor is well established [87-89]. It is also known that the inhibition of tyrosine phosphatases antagonizes Fas-mediated apoptosis [90]. The fact that the major substrate of CD45 is p56lck has challenged the hypothesis that CD45 and/or p56lck might be implicated in apoptosis pathway. Using normal, CD45-deficient or p56lck-deficient Jurkat T cell lines, it was shown that Fas-induced apoptosis is not affected [91,92]. Hence, CD45 might not be implicated in the direct cellular events mediated by the triggering of Fas and leading to cell death. However, the cells that were used in the latter studies were the T cell line Jurkat, (clone J45.01), which are not completely deficient in the expression of CD45 (8% compared to the parent line) [19]. Thus, other studies are needed using a cell line completely deficient in CD45 expression in order to determine the implication of the CD45 in Fas-mediated apoptosis.

In another experimental context, it was demonstrated that upon activation with superantigens, human T cells that express B220, a CD45 isoform normally expressed in murine B cells, easily died by apoptosis [93]. The expression of B220 was up-regulated during the progression from proliferation to anergy, and maximum expression was on T cells undergoing apoptosis. Human and mouse T cells expressing this marker displayed a defect in the signaling of apoptosis mediated by Fas *in vivo*. B220 expression is at its peak when cells are dying by apoptosis [93,94]. Thus, B220 expression suggest it involvement in the clearance pathway at the end of the response. The precise type of CD45 B220 isoform detected in the human T cells is unknown but appears to possess the

three extracellular portions encoded by the A, B and C exons. Moreover, lectin binding studies performed on the molecule revealed that the B220 expression in activated human T cells is the results of core-2 glycan biosynthesis affecting CD45 [93]. It has also been demonstrated that the increased sialylation at the cell surface is playing a role in modulating the sensitivity towards Fas-mediated cell death [95,96]. Thus, the glycan modification in CD45, which peaks at the onset of apoptosis, parallels the up-regulated expression of Fas and FasL and may exert a certain influence on the Fas-mediated apoptotic pathway.

4) Involvement of CD45 in the regulation of the intrinsic mitochondrial pathway by chemical-induced apoptosis

Very few studies have been done on the role of CD45 in the apoptosis that is induced by chemicals such as chemotherapy drugs or environmental pollutants. We previously demonstrated that CD45 could regulate the apoptosis induced by mitochondrial perturbators such as tributyltin (TBT) and hydrogen peroxide (H₂O₂) [97,98]. TBT is a biocide agent used in antifouling paints that provokes potent immunotoxic effects in mammals, characterized *in vivo* by thymic atrophy and reduction of peripheral lymphocytes, by an antiproliferative and apoptotic mechanism [99,100]. TBT has been found to induce apoptosis of multiple types of promyeloid and lymphoid cell lines *in vitro* [101-103]. TBT induces apoptosis in lymphoid cell lines by the classical mitochondrial pathway [101]. We demonstrated that CD45 is involved in the DNA fragmentation and DNA condensation process associated with TBT-induced apoptosis [98]. When exposed to TBT, CD45 negative cell lines are resistant to nuclear apoptosis,

in contrast to CD45 positive cells. The involvement of CD45 in nuclear apoptosis inhibition was confirmed by the CD45 transfection in CD45 deficient T cell lines that led to the restoration of chromatin condensation and DNA fragmentation following TBT exposure [98]. In both CD45 positive and negative T cell lines, other hallmarks of apoptosis are detectable such as intracellular calcium mobilization, mitochondrial membrane potential dissipation, mitochondria cytochrome c releases, caspase-3 activation and DFF45 cleavage. Moreover, subcellular partitioning indicated a decrease in nuclear localization of caspase-3 and DFF40. Studies in a cell-free system revealed that the defective signal responsible for the lack of nuclear apoptosis in CD45 negative cell lines was located in the cytoplasm downstream of caspase-3 activation. Lack of nuclear apoptosis was also observed with H₂O₂ but the involvement of CD45 in nuclear apoptosis depended on the induced pathways since cycloheximide leads to DNA fragmentation in CD45-deficient cells. Moreover, DNA fragmentation was also induced by TBT in cells deficient in the expression of p56lck, ZAP-70 and SHP-1, thus excluding the possible implication of CD45 substrates p56lck, ZAP-70 and another tyrosine phosphatase SHP-1. In another study, we demonstrated that CD45 plays a significant role in nuclear apoptosis through the regulation of ionic homeostasis [97]. Deregulation of ion transport in apoptotic cells leads to changes in intracellular ion levels and disrupts enzyme activity. Our results showed a disturbance of ionic homeostasis in CD45-deficient lymphocytes compared to normal lymphocytes [97]. CD45-deficient cells were shown to lose capacity to reduce their cellular volume and intracellular pH acidification after TBT exposure two processes required for DNA fragmentation [104,105]. CD45-cells have also lost the phosphatidylserine flipping, which is not surprising since

intracellular acidification has been shown to be required for this process [106]. Our results are consistent with those of Walzel *et al.* [69] that proved that galectin-1 induces higher levels of phosphatidylserine in CD45+ cells as compared to CD45- Jurkat cells [69]. Furthermore, it was shown that phosphatidylserine was exposed constitutively at high levels on T lymphocytes that express low levels of the isoform CD45RB and on CD45-deficient B cells [107,108]. The authors suggested that CD45 might inhibit phosphatidylserine redistribution in response to various non-apoptotic signals [107] confirming a possible role for CD45 in the flip-flop process. We also showed that the phosphorylation levels of the chloride channels are considerably inhibited in CD45- cells [97], suggesting the loss of their activation, which is in agreement with the loss of volume and intracellular acidification that are controlled by chloride channels [109]. It is known that the inhibition of Cl⁻ efflux inhibits DNA fragmentation [110]. Therefore we showed that a hypotonic medium, which induces Cl⁻ efflux, significantly increases DNA fragmentation in CD45-deficient cells [97]. Regulation of the chloride channel by the CD45 can be made through its well-known substrates p56lck and p59fyn that are well-established regulators of chloride channel [111,112]. These results demonstrate for the first time the involvement of CD45 in the regulation of internucleosomal DNA fragmentation and the nuclear condensation process during apoptosis. Figure 2 summarizes the apoptotic events following chemically-induced apoptosis in cells that are deficient for CD45 expression.

The involvement of protein kinases has been well established in apoptosis. In CD45- cells, there is a hyperphosphorylated state of its substrates, the initial phosphorylation

pattern is higher in CD45⁻ cells compared to CD45⁺ cells in which there is a rise in tyrosine phosphorylation after apoptosis induction [97]. The importance of the tyrosine phosphorylation pathway in nuclear apoptosis has been confirmed by the inhibition of DNA fragmentation in CD45⁺ cells following exposure to a tyrosine kinase inhibitor [97]. As CD45 regulates the Src kinase family, it is therefore possible that a link exists between CD45 expression and the activation of Lck or Fyn. It has been demonstrated that the principal CD45 substrate, p56lck, is hyperphosphorylated and that the kinase activity of p56lck from cells lacking CD45 is substantially increased [113]. Those results confirms the possible involvement of p56lck and/or downstream kinases in our model. Other studies have demonstrated that the tyrosine kinase p56lck is involved in the regulation of apoptosis induced by the mitochondrial pathway [114-116]. In our study, nuclear apoptosis was induced in p56lck-deficient cells exposed to TBT, suggesting that p56lck does not have a direct role in CD45⁻ cells resistant to nuclear apoptosis [98]. However, the increased activity of this kinase suggests that other kinases can play a role by up-regulating their activity.

Very few studies have evaluated apoptosis in CD45-deficient cells. Anand and Ganju [117] evaluated nuclear apoptosis by TUNEL assay with the J45.01 cell line exposed to an anti-Fas antibody, anti-CD3 antibody, staurosporine and ionizing radiation [117]. No inhibition of apoptosis or nuclear apoptosis was reported in these cells, confirming that a low CD45 expression is enough to induce nuclear apoptosis. Recently, Liu et al. [118] showed that CD45⁺ myeloma cell lines were more sensitive to various apoptotic stimuli, such as oxidative stress and endoplasmic reticulum stress, than CD45⁻ cells. Increased

susceptibility to apoptosis in CD45+ myeloma cells was accompanied by an increase in VDAC1 expression [118].

5) Role of CD45 in HIV-1 mediated apoptosis

A hallmark of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection has been the depletion of CD4+ T cells due to apoptosis resulting in fatal consequences of severe immunodeficiency [119]. The mechanisms through which HIV infection induces T cell death are one of the most controversial issues in AIDS research. Various mechanisms are implicated in apoptosis induction by HIV-1 responsible for lymphocyte depletion such as the apoptosis of bystander uninfected cells, inactivation of anti-apoptotic proteins like Bcl-2, or increased levels of cellular pro-apoptotic proteins. Guntermann *et al.* [120] have demonstrated that during HIV infection the CD45 activity was profoundly impaired with reduced tyrosine kinase signaling and PLC- γ function [120]. The authors suggested that CD3 and CD4 signaling could induce an impaired proliferative response to antigen, anergy and apoptosis induction. The impairment of CD45 tyrosine phosphatase activity correlates with disease progression and the level of T cell apoptosis [121]. Many viral proteins like Tat, Vpr, Nef, gp120 have apoptotic properties [122,123]. The HIV-1 gp120 envelop protein is known to induce apoptosis by activation-induced cell death [124,125]. Because CD45 plays an essential role in TCR signaling, Anand and Ganju, [117] analyzed the implication of CD45 in apoptosis induction. The gp120-induced apoptosis was significantly reduced in CD45- cell lines. CD45 could modulate gp120-apoptosis by regulating Fas ligand induction and via the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway. Because the expression of a chimeric protein containing only the intracellular

domain of CD45 did not restore apoptosis induction, it was suggested that the extracellular domain of CD45 could play a role in this process [117]. Results obtained from various studies on the role of CD45 in HIV apoptosis are contradictory. However there is an agreement that CD45 has a significant role in apoptosis.

Perspectives

CD45 deficiency or altered expression is associated with various diseases. For instance, two studies reported that a deletion in the gene encoding for CD45 (PTPRC, located on gene map locus 1 q31-32) was causing SCID in children [27,28]. These findings agreed with the phenotypes observed in CD45-deficient mice and further substantiate the involvement of CD45 in antigen receptor signaling and T and B cell development [27]. During lupus erythematosus, autoantibodies raised against CD45 that is expressed on T cells but not on B cells are generated, which results in the neutralization of activated T cells through anergy or apoptosis [126,127]. This process appears to be dependant on the glycosylation state of CD45 molecules. Moreover, the expression level of CD45 is up-regulated in microglia cells of patients with Alzheimer's disease. CD45 up-regulation inhibits the microglial activation induced by B-amyloid peptide and CD40 ligand, which is responsible of the neurodegenerative effects observed in Alzheimer's disease, as well as multiple sclerosis and Creutzfeld-Jacob disease [128,129]. Brains of CD45-deficient mice with Alzheimer exhibit an increase in TNF-alpha production compared to control mice [129]. This is an important feature as the therapeutic modulation of CD45 could be used as a treatment for the blockage of microglial activation associated with neurodegenerative diseases. The expression of CD45 is lost in over 10% of patients with

acute lymphoblastic lymphoma [130] and is also frequently lost in patients with Hodgkin's lymphoma and multiple myelomas [131-133]. Furthermore, *in vivo* disease progression is delayed in relation with a high proportion of CD45+ myeloma cells in a murine model [134]. Importantly, patients with CD45- multiple myeloma that receive high-dose therapy have a shorter survival time than those with CD45+ multiple myeloma [135]. Although nuclear apoptosis does not represent an obligatory event, it prevents the spread of genetic information from apoptotic cancer cells to neighboring cells and reduces the chance of inducing auto-chromatin antibodies associated with auto-immune disease [136,137]. A promising approach is currently being developed for a novel treatment option in leukemia therapy. The treatment consists in targeted radiotherapy using radiolabeled monoclonal anti-CD45 antibodies [138,139]. This could be a good alternative for patients that are resistant to chemotherapy or radiotherapy. However, the treatment wouldn't be as effective for patients who have lost CD45 expression.

Many studies have demonstrated an implication of CD45 in apoptosis regulation, but very little is known about the mechanisms and pathways involved in this process. As CD45 is at the initial step of the intracellular signaling in immune cells it could involve many protein kinases and phosphatases downstream of the CD45 signal. One good candidate would be the proto-oncogene Akt, a serine-threonine protein kinase. Descamps *et al.*, [140] demonstrated that Akt activation is highly related to whether CD45 is expressed or not in myeloma cells. Indeed, both the magnitude and the duration of Akt phosphorylation in response to IGF-1 are more important in CD45- than in CD45+ myeloma cell lines [140]. Akt is a well known inhibitor of apoptosis by, among others,

phosphorylating Bad (Bcl-2 family member), caspase-9 (initiator caspase in the mitochondrial pathway) and XIAP (caspase inhibitor) [141-143]. It would also be interesting to evaluate the activity of the protein kinase C delta (PKC δ) in CD45- cells. PKC δ is activated by various apoptotic stimuli. It is activated by its cleavage by caspase after its phosphorylation by the Src family, the principal substrates for the CD45. Activation of PKC δ allows cytochrome c release [144], lamin B phosphorylation that is essential for lamin cleavage [145] and DNA-protein kinase (DNA-PK) phosphorylation which increases apoptosis induction [146]. MAPkinase involvement in apoptosis is contradictory, depending of the cell type and the apoptosis inducer. Despite that fact, determination of the level of activation of these kinases in CD45- cells would be interesting. For example, Erk activation can protect cells from cisplatin-induced apoptosis [147], p38 activation inhibits apoptosis by phosphorylation of caspase-8 [148], while JNK activation can increase apoptosis by inactivation of Bcl-2 family members [149]. We previously showed that cycloheximide can induce apoptosis in CD45-deficient T cells [98]. As cycloheximide is an inhibitor of protein synthesis, a possible hypothesis would be that the high level phosphorylation state of proteins in CD45- cells indicates an increase in kinase activity and therefore an increase in anti-apoptotic protein synthesis inhibiting apoptosis. As CD45 seems to have a major role in the regulation of DNA fragmentation it would also be interesting to evaluate the activity of the DFF40 endonuclease. Indeed, the molecular control of DFF40 activation by co-stimulation molecule is not well understood. Various protein kinases and phosphatases are located downstream of CD45 signaling and could be involved in DFF40 regulation. Furthermore, a perturbation of the ionic homeostasis in CD45- cells could also be responsible for the

inhibition of DFF40's activity. The identity of the key targets is not known and is still under investigation in our laboratory.

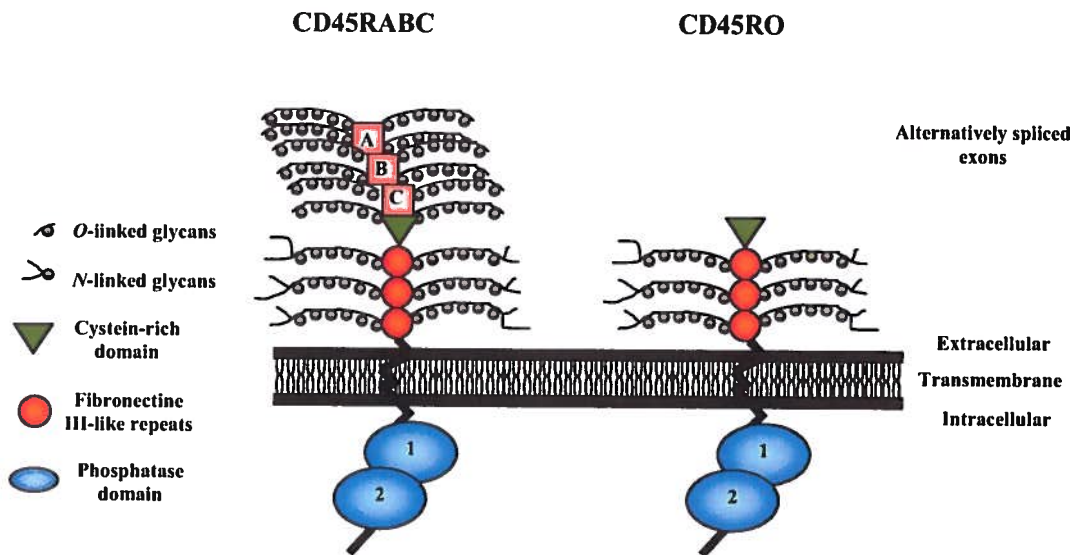


Figure 1 : Structure of CD45RABC isoform (The largest isoform) and CD45R0 isoform (The smallest isoform). In contrast to the CD45R0 isoform, the CD45RABC isoform has all three alternatively spliced domain denoted A, B and C. The CD45 intracytoplasmic region contains the two phosphatase domains.

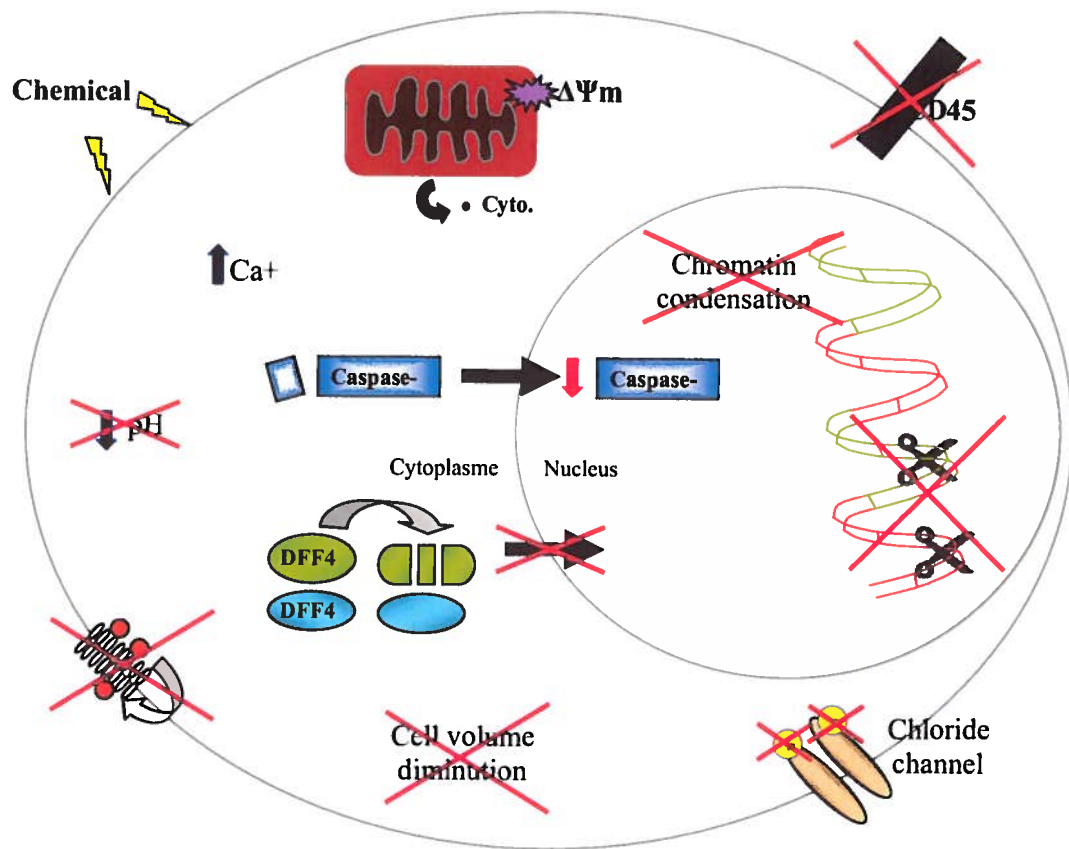


Figure 2: Events in CD45-deficient cells after apoptosis induction via mitochondria perturbing agents. No nuclear apoptosis is observed (chromatin condensation and DNA fragmentation) despite the fact that mitochondrial membrane potential is disrupted, cytochrome c is released, intracellular calcium is increased, caspase-3 is activated and DFF45 is cleaved. On the other hand, nuclear localization of caspase-3 and DFF40 is diminished and phosphatidylserine externalization is lacking. Ionic homeostasis regulation is also disrupted as no volume reduction, pH acidification and chloride channel phosphorylation are observed.

References

1. Penninger, J. M., Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., Oliveira-dos-Santos, A. J. (2001) CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat Immunol* 2: 389-96.
2. Trowbridge, I. S., Thomas, M. L. (1994) CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 12: 85-116.
3. Hermiston, M. L., Xu, Z., Weiss, A. (2003) CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 21: 107-37.
4. McNeill, L., Cassady, R. L., Sarkardei, S., Cooper, J. C., Morgan, G., Alexander, D. R. (2004) CD45 isoforms in T cell signalling and development. *Immunol Lett* 92: 125-34.
5. Earl, L. A., Baum, L. G. (2008) CD45 glycosylation controls T-cell life and death. *Immunol Cell Biol* 86: 608-15.
6. Kashio, N., Matsumoto, W., Parker, S., Rothstein, D. M. (1998) The second domain of the CD45 protein tyrosine phosphatase is critical for interleukin-2 secretion and substrate recruitment of TCR-zeta in vivo. *J Biol Chem* 273: 33856-63.
7. Lokeshwar, V. B., Bourguignon, L. Y. (1992) Tyrosine phosphatase activity of lymphoma CD45 (GP180) is regulated by a direct interaction with the cytoskeleton. *J Biol Chem* 267: 21551-7.
8. Iida, N., Lokeshwar, V. B., Bourguignon, L. Y. (1994) Mapping the fodrin binding domain in CD45, a leukocyte membrane-associated tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 269: 28576-83.
9. Fukuhara, K., Okumura, M., Shiono, H., Inoue, M., Kadota, Y., Miyoshi, S., Matsuda, H. (2002) A study on CD45 isoform expression during T-cell development and selection events in the human thymus. *Hum Immunol* 63: 394-404.
10. Virts, E., Barritt, D., Raschke, W. C. (1998) Expression of CD45 isoforms lacking exons 7, 8 and 10. *Mol Immunol* 35: 167-76.
11. Symons, A., Willis, A. C., Barclay, A. N. (1999) Domain organization of the extracellular region of CD45. *Protein Eng* 12: 885-92.

12. Arendt, C. W., Ostergaard, H. L. (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* 272: 13117-25.
13. Tchilian, E. Z., Beverley, P. C. (2006) Altered CD45 expression and disease. *Trends Immunol* 27: 146-53.
14. Majeti, R., Xu, Z., Parslow, T. G., Olson, J. L., Daikh, D. I., Killeen, N., Weiss, A. (2000) An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity. *Cell* 103: 1059-70.
15. Leitenberg, D., Novak, T. J., Farber, D., Smith, B. R., Bottomly, K. (1996) The extracellular domain of CD45 controls association with the CD4-T cell receptor complex and the response to antigen-specific stimulation. *J Exp Med* 183: 249-59.
16. Leitenberg, D., Boutin, Y., Lu, D. D., Bottomly, K. (1999) Biochemical association of CD45 with the T cell receptor complex: regulation by CD45 isoform and during T cell activation. *Immunity* 10: 701-11.
17. Kozieradzki, I., Kundig, T., Kishihara, K., Ong, C. J., Chiu, D., Wallace, V. A., Kawai, K., Timms, E., Ionescu, J., Ohashi, P., Marth, J. D., Mak, T. W., Penninger, J. M. (1997) T cell development in mice expressing splice variants of the protein tyrosine phosphatase CD45. *J Immunol* 158: 3130-9.
18. Pingel, J. T., Thomas, M. L. (1989) Evidence that the leukocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation. *Cell* 58: 1055-65.
19. Koretzky, G. A., Picus, J., Schultz, T., Weiss, A. (1991) Tyrosine phosphatase CD45 is required for T-cell antigen receptor and CD2-mediated activation of a protein tyrosine kinase and interleukin 2 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2037-41.
20. Kishihara, K., Penninger, J., Wallace, V. A., Kundig, T. M., Kawai, K., Wakeham, A., Timms, E., Pfeffer, K., Ohashi, P. S., Thomas, M. L. et al (1993) Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* 74: 143-56.
21. Byth, K. F., Conroy, L. A., Howlett, S., Smith, A. J., May, J., Alexander, D. R., Holmes, N. (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* 183: 1707-18.
22. Trop, S., Charron, J., Arguin, C., Lesage, S., Hugo, P. (2000) Thymic selection generates T cells expressing self-reactive TCRs in the absence of CD45. *J Immunol* 165: 3073-9.

23. Koretzky, G. A., Picus, J., Thomas, M. L., Weiss, A. (1990) Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway. *Nature* 346: 66-8.
24. Huntington, N. D., Tarlinton, D. M. (2004) CD45: direct and indirect government of immune regulation. *Immunol Lett* 94: 167-74.
25. Thomas, S. M., Brugge, J. S. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 513-609.
26. Cale, C. M., Klein, N. J., Novelli, V., Veys, P., Jones, A. M., Morgan, G. (1997) Severe combined immunodeficiency with abnormalities in expression of the common leucocyte antigen, CD45. *Arch Dis Child* 76: 163-4.
27. Kung, C., Pingel, J. T., Heikinheimo, M., Klemola, T., Varkila, K., Yoo, L. I., Vuopala, K., Poyhonen, M., Uhari, M., Rogers, M., Speck, S. H., Chatila, T., Thomas, M. L. (2000) Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nat Med* 6: 343-5.
28. Tchilian, E. Z., Wallace, D. L., Wells, R. S., Flower, D. R., Morgan, G., Beverley, P. C. (2001) A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID. *J Immunol* 166: 1308-13.
29. Mee, P. J., Turner, M., Basson, M. A., Costello, P. S., Zamoyska, R., Tybulewicz, V. L. (1999) Greatly reduced efficiency of both positive and negative selection of thymocytes in CD45 tyrosine phosphatase-deficient mice. *Eur J Immunol* 29: 2923-33.
30. Ashwell, J. D., D'Oro, U. (1999) CD45 and Src-family kinases: and now for something completely different. *Immunol Today* 20: 412-6.
31. Thomas, M. L., Brown, E. J. (1999) Positive and negative regulation of Src-family membrane kinases by CD45. *Immunol Today* 20: 406-11.
32. Seavitt, J. R., White, L. S., Murphy, K. M., Loh, D. Y., Perlmutter, R. M., Thomas, M. L. (1999) Expression of the p56(Lck) Y505F mutation in CD45-deficient mice rescues thymocyte development. *Mol Cell Biol* 19: 4200-8.
33. Frearson, J. A., Alexander, D. R. (1996) Protein tyrosine phosphatases in T-cell development, apoptosis and signalling. *Immunol Today* 17: 385-91.
34. Mustelin, T., Williams, S., Taylor, P., Couture, C., Zenner, G., Burn, P., Ashwell, J. D., Altman, A. (1995) Regulation of the p70zap tyrosine protein kinase in T cells by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Eur J Immunol* 25: 942-6.

35. Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., Matsumoto, W., Opavsky, A., Cheng, M., Welstead, G., Griffiths, E., Krawczyk, C., Richardson, C. D., Aitken, K., Iscove, N., Koretzky, G., Johnson, P., Liu, P., Rothstein, D. M., Penninger, J. M. (2001) CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 409: 349-54.
36. Kirchberger, S., Majdic, O., Bluml, S., Schrauf, C., Leitner, J., Gerner, C., Paster, W., Gundacker, N., Sibilica, M., Stockl, J. (2008) The cytoplasmic tail of CD45 is released from activated phagocytes and can act as an inhibitory messenger for T cells. *Blood* 112: 1240-8.
37. Yamada, A., Streuli, M., Saito, H., Rothstein, D. M., Schlossman, S. F., Morimoto, C. (1990) Effect of activation of protein kinase C on CD45 isoform expression and CD45 protein tyrosine phosphatase activity in T cells. *Eur J Immunol* 20: 1655-60.
38. Stover, D. R., Charbonneau, H., Tonks, N. K., Walsh, K. A. (1991) Protein-tyrosine-phosphatase CD45 is phosphorylated transiently on tyrosine upon activation of Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7704-7.
39. Ostergaard, H. L. Trowbridge, I. S. (1991) Negative regulation of CD45 protein tyrosine phosphatase activity by ionomycin in T cells. *Science* 253: 1423-5.
40. Wang, Y., Guo, W., Liang, L., Esselman, W. J. (1999) Phosphorylation of CD45 by casein kinase 2. Modulation of activity and mutational analysis. *J Biol Chem* 274: 7454-61.
41. Greer, S. F., Wang, Y., Raman, C., Justement, L. B. (2001) CD45 function is regulated by an acidic 19-amino acid insert in domain II that serves as a binding and phosphoacceptor site for casein kinase 2. *J Immunol* 166: 7208-18.
42. Motoya, S., Kitamura, K., Matsuda, A., Maizel, A. L., Yamamoto, H., Takeda, A. (1999) Interaction between CD45-AP and protein-tyrosine kinases involved in T cell receptor signaling. *J Biol Chem* 274: 1407-14.
43. Majeti, R., Bilwes, A. M., Noel, J. P., Hunter, T., Weiss, A. (1998) Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge. *Science* 279 : 88-91.
44. Desai, D. M., Sap, J., Schlessinger, J., Weiss, A. (1993) Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase. *Cell* 73: 541-54.
45. Bilwes, A. M., den Hertog, J., Hunter, T., Noel, J. P. (1996) Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization. *Nature* 382: 555-9.

46. Novak, T. J., Farber, D., Leitenberg, D., Hong, S. C., Johnson, P., Bottomly, K. (1994) Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T cell recognition. *Immunity* 1: 109-19.
47. Dornan, S., Sebestyen, Z., Gamble, J., Nagy, P., Bodnar, A., Alldridge, L., Doe, S., Holmes, N., Goff, L. K., Beverley, P., Szollosi, J., Alexander, D. R. (2002) Differential association of CD45 isoforms with CD4 and CD8 regulates the actions of specific pools of p56lck tyrosine kinase in T cell antigen receptor signal transduction. *J Biol Chem* 277: 1912-8.
48. Xu, Z., Weiss, A. (2002) Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. *Nat Immunol* 3: 764-71.
49. Holmes, N. (2006) CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology* 117: 145-55 .
50. Birkeland, M. L., Johnson, P., Trowbridge, I. S., Pure, E. (1989) Changes in CD45 isoform expression accompany antigen-induced murine T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6734-8.
51. Nam, H. J., Poy, F., Saito, H., Frederick, C. A. (2005) Structural basis for the function and regulation of the receptor protein tyrosine phosphatase CD45. *J Exp Med* 201: 441-52.
52. Reed, J. C. (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157: 1415-30.
53. Hengartner, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-6.
54. Gulbins, E., Jekle, A., Ferlinz, K., Grassme, H., Lang, F. (2000) Physiology of apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F605-15.
55. Widlak, P. (2000) The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim Pol* 47: 1037-44.
56. Blaylock, M. G., Sexton, D. W., Walsh, G. M. (1999) Ligation of CD45 and the isoforms CD45RA and CD45RB accelerates the rate of constitutive apoptosis in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 104: 1244-50.
57. Lesage, S., Steff, A. M., Philippoussis, F., Page, M., Trop, S., Mateo, V., Hugo, P. (1997) CD4+ CD8+ thymocytes are preferentially induced to die following CD45 cross-linking, through a novel apoptotic pathway. *J Immunol* 159: 4762-71.
58. Ogimoto, M., Katagiri, T., Mashima, K., Hasegawa, K., Mizuno, K., Yakura, H. (1994) Negative regulation of apoptotic death in immature B cells by CD45. *Int Immunol* 6: 647-54.
59. Klaus, S. J., Sidorenko, S. P., Clark, E. A. (1996) CD45 ligation induces programmed cell death in T and B lymphocytes. *J Immunol* 156: 2743-53.

60. Fortin, M., Steff, A. M., Felberg, J., Ding, I., Schraven, B., Johnson, P., Hugo, P. (2002) Apoptosis mediated through CD45 is independent of its phosphatase activity and association with leukocyte phosphatase-associated phosphoprotein. *J Immunol* 168: 6084-9.
61. Blank, N., Kriegel, M., Hieronymus, T., Geiler, T., Winkler, S., Kalden, J. R., Lorenz, H. M. (2001) CD45 tyrosine phosphatase controls common gamma-chain cytokine-mediated STAT and extracellular signal-related kinase phosphorylation in activated human lymphoblasts: inhibition of proliferation without induction of apoptosis. *J Immunol* 166: 6034-40.
62. Vas, V., Fajka-Boja, R., Ion, G., Dudics, V., Monostori, E., Uher, F. (2005) Biphasic effect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells. *Stem Cells* 23: 279-87.
63. Perillo, N. L., Marcus, M. E., Baum, L. G. (1998) Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med* 76: 402-12.
64. Symons, A., Cooper, D. N., Barclay, A. N. (2000) Characterization of the interaction between galectin-1 and lymphocyte glycoproteins CD45 and Thy-1. *Glycobiology* 10: 559-63.
65. Nguyen, J. T., Evans, D. P., Galvan, M., Pace, K. E., Leitenberg, D., Bui, T. N., Baum, L. G. (2001) CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. *J Immunol* 167: 5697-707.
66. Perillo, N. L., Pace, K. E., Seilhamer, J. J., Baum, L. G. (1995) Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378: 736-9.
67. Perillo, N. L., Uittenbogaart, C. H., Nguyen, J. T., Baum, L. G. (1997) Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J Exp Med* 185: 1851-8.
68. Vespa, G. N., Lewis, L. A., Kozak, K. R., Moran, M., Nguyen, J. T., Baum, L. G., Miceli, M. C. (1999) Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 162: 799-806.
69. Walzel, H., Schulz, U., Neels, P., Brock, J. (1999) Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45. *Immunol Lett* 67: 193-202.
70. Pang, M., He, J., Johnson, P., Baum, L. G. (2009) CD45-mediated fodrin cleavage during galectin-1 T cell death promotes phagocytic clearance of dying cells. *J Immunol* 182: 7001-8.
71. Wallace, V. A., Fung-Leung, W. P., Timms, E., Gray, D., Kishihara, K., Loh, D. Y., Penninger, J., Mak, T. W. (1992) CD45RA and CD45RB^{high} expression induced by thymic selection events. *J Exp Med* 176: 1657-63.

72. Baum, L. G., Pang, M., Perillo, N. L., Wu, T., Delegeane, A., Uittenbogaart, C. H., Fukuda, M., Seilhamer, J. J. (1995) Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J Exp Med* 181: 877-87.
73. Rabinovich, G. A., Ramhorst, R. E., Rubinstein, N., Corigliano, A., Daroqui, M. C., Kier-Joffe, E. B., Fainboim, L. (2002) Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms. *Cell Death Differ* 9: 661-70.
74. Fajka-Boja, R., Szemes, M., Ion, G., Legradi, A., Caron, M., Monostori, E. (2002) Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines. *Immunol Lett* 82: 149-54.
75. Pace, K. E., Lee, C., Stewart, P. L., Baum, L. G. (1999) Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J Immunol* 163: 3801-11.
76. Serrador, J. M., Nieto, M., Alonso-Lebrero, J. L., del Pozo, M. A., Calvo, J., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Lozano, F., Gonzalez-Amaro, R., Sanchez-Mateos, P., Sanchez-Madrid, F. (1998) CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood* 91: 4632-44.
77. Amano, M., Galvan, M., He, J., Baum, L. G. (2003) The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death. *J Biol Chem* 278: 7469-75.
78. Fouillit, M., Joubert-Caron, R., Poirier, F., Bourin, P., Monostori, E., Levi-Strauss, M., Raphael, M., Bladier, D., Caron, M. (2000) Regulation of CD45-induced signaling by galectin-1 in Burkitt lymphoma B cells. *Glycobiology* 10: 413-9.
79. Stillman, B. N., Hsu, D. K., Pang, M., Brewer, C. F., Johnson, P., Liu, F. T., Baum, L. G. (2006) Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *J Immunol* 176: 778-89.
80. Bi, S., Earl, L. A., Jacobs, L., Baum, L. G. (2008) Structural features of galectin-9 and galectin-1 that determine distinct T cell death pathways. *J Biol Chem* 283: 12248-58.
81. Wada, J., Ota, K., Kumar, A., Wallner, E. I., Kanwar, Y. S. (1997) Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin. *J Clin Invest* 99: 2452-61.

82. SgROI, D., Varki, A., Braesch-Andersen, S., Stamenkovic, I. (1993) CD22, a B cell-specific immunoglobulin superfamily member, is a sialic acid-binding lectin. *J Biol Chem* 268: 7011-8.
83. SgROI, D., Koretzky, G. A., Stamenkovic, I. (1995) Regulation of CD45 engagement by the B-cell receptor CD22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4026-30 .
84. Altevogt, P., Schreck, J., Schraven, B., Meuer, S., Schirrmacher, V., Mitsch, A. (1990) Association of CD2 and T200 (CD45) in mouse T lymphocytes. *Int Immunol* 2: 353-60.
85. Ma, B. Y., Yoshida, K., Baba, M., Nonaka, M., Matsumoto, S., Kawasaki, N., Asano, S., Kawasaki, T. (2008) The lectin Jacalin induces human B-lymphocyte apoptosis through glycosylation-dependent interaction with CD45. *Immunology*.
86. Baba, M., Yong Ma, B., Nonaka, M., Matsuishi, Y., Hirano, M., Nakamura, N., Kawasaki, N., Kawasaki, N., Kawasaki, T. (2007) Glycosylation-dependent interaction of Jacalin with CD45 induces T lymphocyte activation and Th1/Th2 cytokine secretion. *J Leukoc Biol* 81: 1002-11.
87. Eischen, C. M., Dick, C. J., Leibson, P. J. (1994) Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis. *J Immunol* 153: 1947-54.
88. Zhong, L., Wu, C. H., Lee, W. H., Liu, C. P. (2004) Zeta-associated protein of 70 kDa (ZAP-70), but not Syk, tyrosine kinase can mediate apoptosis of T cells through the Fas/Fas ligand, caspase-8 and caspase-3 pathways. *J Immunol* 172: 1472-82.
89. Szabo, I., Gulbins, E., Apfel, H., Zhang, X., Barth, P., Busch, A. E., Schlottmann, K., Pongs, O., Lang, F. (1996) Tyrosine phosphorylation-dependent suppression of a voltage-gated K⁺ channel in T lymphocytes upon Fas stimulation. *J Biol Chem* 271: 20465-9.
90. Hehner, S. P., Hofmann, T. G., Ratter, F., Droge, W., Schmitz, M. L. (1999) Inhibition of tyrosine phosphatases antagonizes CD95-mediated apoptosis. *Eur J Biochem* 264: 132-9.
91. Schraven, B., Peter, M. E. (1995) APO-1(CD95)-mediated apoptosis in Jurkat cells does not involve src kinases or CD45. *FEBS Lett* 368: 491-4.
92. Latinis, K. M., Koretzky, G. A. (1996) Fas ligation induces apoptosis and Jun kinase activation independently of CD45 and Lck in human T cells. *Blood* 87: 871-5.

93. Bleesing, J. J., Morrow, M. R., Uzel, G., Fleisher, T. A. (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* 213: 72-81.
94. Alexander, D. R. (2000) The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. *Semin Immunol* 12: 349-59.
95. Peter, M. E., Hellbardt, S., Schwartz-Albiez, R., Westendorp, M. O., Walczak, H., Moldenhauer, G., Grell, M., Krammer, P. H. (1995) Cell surface sialylation plays a role in modulating sensitivity towards APO-1-mediated apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 2: 163-71.
96. Keppler, O. T., Peter, M. E., Hinderlich, S., Moldenhauer, G., Stehling, P., Schmitz, I., Schwartz-Albiez, R., Reutter, W., Pawlita, M. (1999) Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus. *Glycobiology* 9: 557-69.
97. Dupere-Minier, G., Hamelin, C., Desharnais, P., Bernier, J. (2004) Apoptotic volume decrease, pH acidification and chloride channel activation during apoptosis requires CD45 expression in HPB-ALL T cells. *Apoptosis* 9: 543-51.
98. Desharnais, P., Dupere-Minier, G., Hamelin, C., Devine, P., Bernier, J. (2008) Involvement of CD45 in DNA fragmentation in apoptosis induced by mitochondrial perturbing agents. *Apoptosis* 13: 197-212.
99. Raffray, M., Cohen, G. M. (1993) Thymocyte apoptosis as a mechanism for tributyltin-induced thymic atrophy in vivo. *Arch Toxicol* 67: 231-6.
100. Gennari, A., Potters, M., Seinen, W., Pieters, R. (1997) Organotin-induced apoptosis as observed in vitro is not relevant for induction of thymus atrophy at antiproliferative doses. *Toxicol Appl Pharmacol* 147: 259-66.
101. Stridh, H., Kimland, M., Jones, D. P., Orrenius, S., Hampton, M. B. (1998) Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis. *FEBS Lett* 429: 351-5.
102. Stridh, H., Orrenius, S., Hampton, M. B. (1999) Caspase involvement in the induction of apoptosis by the environmental toxicants tributyltin and triphenyltin. *Toxicol Appl Pharmacol* 156: 141-6.
103. Thompson, T. A., Lewis, J. M., Dejneka, N. S., Severs, W. B., Polavarapu, R., Billingsley, M. L. (1996) Induction of apoptosis by organotin compounds in vitro: neuronal protection with antisense oligonucleotides directed against stannin. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 1201-16.

104. Maeno, E., Ishizaki, Y., Kanaseki, T., Hazama, A., Okada, Y. (2000) Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9487-92.
105. Szabo, I., Lepple-Wienhues, A., Kaba, K. N., Zoratti, M., Gulbins, E., Lang, F. (1998) Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6169-74.
106. Meisenholder, G. W., Martin, S. J., Green, D. R., Nordberg, J., Babor, B. M., Gottlieb, R. A. (1996) Events in apoptosis. Acidification is downstream of protease activation and BCL-2 protection. *J Biol Chem* 271: 16260-2.
107. Elliott, J. I., Surprenant, A., Marelli-Berg, F. M., Cooper, J. C., Cassady-Cain, R. L., Wooding, C., Linton, K., Alexander, D. R., Higgins, C. F. (2005) Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat Cell Biol* 7: 808-16.
108. Elliott, J. I., Sardini, A., Cooper, J. C., Alexander, D. R., Davanture, S., Chimini, G., Higgins, C. F. (2006) Phosphatidylserine exposure in B lymphocytes: a role for lipid packing. *Blood* 108: 1611-7.
109. Okada, Y., Maeno, E. (2001) Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130: 377-83.
110. Kawane, K., Fukuyama, H., Yoshida, H., Nagase, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Okada, K., Iida, T., Nagata, S. (2003) Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. *Nat Immunol* 4: 138-44.
111. Lepple-Wienhues, A., Szabo, I., Laun, T., Kaba, N. K., Gulbins, E., Lang, F. (1998) The tyrosine kinase p56lck mediates activation of swelling-induced chloride channels in lymphocytes. *J Cell Biol* 141: 281-6.
112. Edwards, J. C., Kapadia, S. (2000) Regulation of the bovine kidney microsomal chloride channel p64 by p59fyn, a Src family tyrosine kinase. *J Biol Chem* 275: 31826-32.
113. D'Oro, U., Ashwell, J. D. (1999) Cutting edge: the CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes. *J Immunol* 162: 1879-83.
114. Hur, Y. G., Yun, Y., Won, J. (2004) Rosmarinic acid induces p56lck-dependent apoptosis in Jurkat and peripheral T cells via mitochondrial pathway independent from Fas/Fas ligand interaction. *J Immunol* 172: 79-87.
115. Manna, S. K., Sah, N. K., Aggarwal, B. B. (2000) Protein tyrosine kinase p56lck is required for ceramide-induced but not tumor necrosis factor-induced activation of NF-kappa B, AP-1, JNK, and apoptosis. *J Biol Chem* 275: 13297-306.

116. Sharif-Askari, E., Gaucher, D., Halwani, R., Ma, J., Jao, K., Abdallah, A., Haddad, E. K., Sekaly, R. P. (2007) p56Lck tyrosine kinase enhances the assembly of death-inducing signaling complex during Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 282: 36048-56.
117. Anand, A. R., Ganju, R. K. (2006) HIV-1 gp120-mediated apoptosis of T cells is regulated by the membrane tyrosine phosphatase CD45. *J Biol Chem* 281: 12289-99.
118. Liu, S., Ishikawa, H., Tsuyama, N., Li, F. J., Abroun, S., Otsuyama, K. I., Zheng, X., Ma, Z., Maki, Y., Iqbal, M. S., Obata, M., Kawano, M. M. (2006) Increased susceptibility to apoptosis in CD45(+) myeloma cells accompanied by the increased expression of VDAC1. *Oncogene* 25: 419-29.
119. Shedlock, D. J., Hwang, D., Choo, A. Y., Chung, C. W., Muthumani, K., Weiner, D. B. (2008) HIV-1 viral genes and mitochondrial apoptosis. *Apoptosis* 13: 1088-99.
120. Guntermann, C., Amft, N., Murphy, B. J., Nye, K. E. (1998) Impaired CD45-associated tyrosine phosphatase activity during HIV-1 infection: implications for CD3 and CD4 receptor signalling. *Biochem Biophys Res Commun* 252: 69-77.
121. Giovannetti, A., Pierdominici, M., Mazzetta, F., Mazzone, A. M., Ricci, G., Prozzo, A., Pandolfi, F., Paganelli, R., Aiuti, F. (2000) HIV type 1-induced inhibition of CD45 tyrosine phosphatase activity correlates with disease progression and apoptosis, but not with anti-CD3-induced T cell proliferation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 211-9.
122. Azad, A. A. (2000) Could Nef and Vpr proteins contribute to disease progression by promoting depletion of bystander cells and prolonged survival of HIV-infected cells? *Biochem Biophys Res Commun* 267: 677-85.
123. Roshal, M., Zhu, Y., Planelles, V. (2001) Apoptosis in AIDS. *Apoptosis* 6: 103-16.
124. Banda, N. K., Bernier, J., Kurahara, D. K., Kurrle, R., Haigwood, N., Sekaly, R. P., Finkel, T. H. (1992) Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med* 176: 1099-106.
125. Westendorp, M. O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K. M., Krammer, P. H. (1995) Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375: 497-500.
126. Mamoune, A., Saraux, A., Delaunay, J. L., Le Goff, P., Youinou, P., Le Corre, R. (1998) Autoantibodies to CD45 in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 11: 485-8.

127. Mamoune, A., Kerdreux, S., Durand, V., Saraux, A., Goff, P. L., Youinou, P., Corre, R. L. (2000) CD45 autoantibodies mediate neutralization of activated T cells from lupus patients through anergy or apoptosis. *Lupus* 9: 622-31.
128. Tan, J., Town, T., Mori, T., Wu, Y., Saxe, M., Crawford, F., Mullan, M. (2000) CD45 opposes beta-amyloid peptide-induced microglial activation via inhibition of p44/42 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 20: 7587-94 .
129. Tan, J., Town, T., Mullan, M. (2000) CD45 inhibits CD40L-induced microglial activation via negative regulation of the Src/p44/42 MAPK pathway. *J Biol Chem* 275: 37224-31.
130. Ratei, R., Sperling, C., Karawajew, L., Schott, G., Schrappe, M., Harbott, J., Riehm, H., Ludwig, W. D. (1998) Immunophenotype and clinical characteristics of CD45-negative and CD45-positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 77: 107-14.
131. Ozdemirli, M., Mankin, H. J., Aisenberg, A. C., Harris, N. L. (1996) Hodgkin's disease presenting as a solitary bone tumor. A report of four cases and review of the literature. *Cancer* 77: 79-88.
132. Ishikawa, H., Mahmoud, M. S., Fujii, R., Abroun, S., Kawano, M. M. (2000) Proliferation of immature myeloma cells by interleukin-6 is associated with CD45 expression in human multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 39: 51-5.
133. Kumar, S., Rajkumar, S. V., Kimlinger, T., Greipp, P. R., Witzig, T. E. (2005) CD45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: clinical and biological correlations. *Leukemia* 19: 1466-70.
134. Asosingh, K., Willems, A., Van Riet, I., Van Camp, B., Vanderkerken, K. (2003) Delayed in vivo disease progression is associated with high proportions of CD45+ myeloma cells in the 5T2MM murine model. *Cancer Res* 63: 3019-20.
135. Moreau, P., Robillard, N., Avet-Loiseau, H., Pineau, D., Morineau, N., Milpied, N., Harousseau, J. L., Bataille, R. (2004) Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma . *Haematologica* 89: 547-51.
136. de la Taille, A., Chen, M. W., Burchardt, M., Chopin, D. K., Buttyan, R. (1999) Apoptotic conversion: evidence for exchange of genetic information between prostate cancer cells mediated by apoptosis. *Cancer Res* 59: 5461-3.
137. Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256: 12-8.
138. Friesen, C., Glatting, G., Koop, B., Schwarz, K., Morgenstern, A., Apostolidis, C., Debatin, K. M., Reske, S. N. (2007) Breaking chemoresistance and radioresistance with. *Cancer Res* 67: 1950-8.
Notes: anti-CD45 antibodies in leukemia cells.

139. Pagel, J. M., Hedin, N., Drouet, L., Wood, B. L., Pantelias, A., Lin, Y., Hamlin, D. K., Wilbur, D. S., Gopal, A. K., Green, D., Appelbaum, F. R., Press, O. W. (2008) Eradication of disseminated leukemia in a syngeneic murine leukemia model using pretargeted anti-CD45 radioimmunotherapy. *Blood* 111: 2261-8.
140. Descamps, G., Pellat-Deceunynck, C., Szpak, Y., Bataille, R., Robillard, N., Amiot, M. (2004) The magnitude of Akt/phosphatidylinositol 3'-kinase proliferating signaling is related to CD45 expression in human myeloma cells. *J Immunol* 173: 4953-9.
141. del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., Nunez, G. (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278: 687-9.
142. Fujita, E., Jinbo, A., Matuzaki, H., Konishi, H., Kikkawa, U., Momoi, T. (1999) Akt phosphorylation site found in human caspase-9 is absent in mouse caspase-9. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 550-5.
143. Dan, H. C., Sun, M., Kaneko, S., Feldman, R. I., Nicosia, S. V., Wang, H. G., Tsang, B. K., Cheng, J. Q. (2004) Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem* 279: 5405-12.
144. Majumder, P. K., Pandey, P., Sun, X., Cheng, K., Datta, R., Saxena, S., Kharbanda, S., Kufe, D. (2000) Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 275: 21793-6.
145. Cross, T., Griffiths, G., Deacon, E., Sallis, R., Gough, M., Watters, D., Lord, J. M. (2000) PKC-delta is an apoptotic lamin kinase. *Oncogene* 19: 2331-7.
146. Bharti, A., Kraeft, S. K., Gounder, M., Pandey, P., Jin, S., Yuan, Z. M., Lees-Miller, S. P., Weichselbaum, R., Weaver, D., Chen, L. B., Kufe, D., Kharbanda, S. (1998) Inactivation of DNA-dependent protein kinase by protein kinase Cdelta: implications for apoptosis. *Mol Cell Biol* 18: 6719-28.
147. Wang, X., Martindale, J. L., Holbrook, N. J. (2000) Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275: 39435-43.
148. Alvarado-Kristensson, M., Melander, F., Leandersson, K., Ronnstrand, L., Wernstedt, C., Andersson, T. (2004) p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils. *J Exp Med* 199: 449-58.
149. Yu, C., Minemoto, Y., Zhang, J., Liu, J., Tang, F., Bui, T. N., Xiang, J., Lin, A. (2004) JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell* 13 : 329-40.

DISCUSSION

Le CD45 est une tyrosine phosphatase transmembranaire de type I exprimé chez toutes les cellules hématopoïétiques nucléées (Penninger *et al.*, 2001). Son expression à la surface des cellules peut représenter jusqu'à 10% de toutes les glycoprotéines de surface (Trowbridge et Thomas, 1994). L'activité phosphatase du CD45 peut représenter plus de 90% de l'activité phosphatase totale de la cellule chez les lymphocytes démontrant l'importance de cette molécule (Isakov, 1993). Le CD45 est un régulateur essentiel de voies de signalisation chez les cellules du système immunitaire. Le rôle principal du CD45 dans la cellule est de réguler l'amplitude de certaines voies de signalisation à l'intérieur de la cellule (Hermiston, Xu et Weiss, 2003). Toutefois, un nouveau rôle pour le CD45 commence à lui être attribué. En effet, le CD45 détient un rôle dans la régulation de l'apoptose. Dans les dernières années, plusieurs études ont été réalisées pour comprendre les mécanismes de régulation de cette mort cellulaire par apoptose où un dérèglement de ce processus est associé à plusieurs pathologies. Notre laboratoire a démontré antérieurement une implication du CD45 dans ce processus de mort cellulaire par la régulation de l'apoptose nucléaire (Dupéré-Minier *et al.*, 2004 ; Desharnais *et al.*, 2008). En effet, en absence de l'expression du CD45 chez les lymphocytes T, il y a absence de condensation de la chromatine et absence de la fragmentation de l'ADN suite à l'induction de l'apoptose par un perturbateur mitochondrial.

Seulement quelques études ont démontré une implication du CD45 dans la régulation de l'apoptose. Récemment, Liu *et al.* (2006) ont démontré que des cellules myéloïdes CD45+ sont plus sensibles à plusieurs stimuli apoptotiques que des cellules myéloïdes CD45-. L'augmentation de la susceptibilité à l'apoptose chez ces cellules myéloïdes CD45+ est accompagnée par une augmentation de l'expression de VDAC1 (Liu *et al.*, 2006). Il a aussi été rapporté une induction de l'apoptose suite à la liaison même du CD45 par des anticorps monoclonaux chez différents types cellulaires du système immunitaire (Ogimoto *et al.*, 1994; Klaus, Sidorenko et Clark, 1996; Lesage *et al.*, 1997; Blaylock, Sexton et Walsh, 1999). Chez des thymocytes, l'induction de l'apoptose par la liaison du CD45 est caractérisée par une réduction du potentiel mitochondrial, la production de ROS, la perte d'asymétrie membranaire, l'exposition de résidus de phosphatidylsérine à la surface de la cellule et l'incorporation de colorant vitaux (Lesage

et al., 1997). Un fait très intéressant est l'absence de fragmentation de l'ADN dans certains modèles suite à l'induction de l'apoptose par la liaison du CD45 (Klaus, Sidorenko et Clark, 1996; Lesage *et al.*, 1997). Cette absence de fragmentation de l'ADN pourrait être causée par une inhibition de l'activité phosphatase du CD45 démontrant l'importance du CD45 dans la régulation de l'apoptose nucléaire. En effet, l'inhibition de l'activité du CD45 se produit lorsqu'il y a liaison du CD45 ce qui induit sa dimérisation bloquant ainsi son activité phosphatase (Desai *et al.*, 1993; Bilwes *et al.*, 1996; Majeti *et al.*, 1998; Majeti *et al.*, 2000). L'apoptose peut également être induite par la galectine-1 un ligand naturel pour le CD45 (Perillo *et al.*, 1995; Perillo *et al.*, 1997; Symons, Cooper et Barclay, 2000; Fajka-Boja *et al.*, 2002). Par contre, le rôle du CD45 dans l'induction de l'apoptose par la galectine-1 est controversé. Le CD45 semble aussi avoir un rôle dans la régulation de l'apoptose induite par le VIH. Parmi quelques études démontrant cette implication, Anand et Ganju (2006) ont récemment démontré une implication du CD45 dans l'apoptose induite par gp120, une protéine virale du VIH. En effet, l'apoptose induite par gp120 est significativement réduite chez les cellules T déficientes pour l'expression du CD45. Le CD45 régulerait l'apoptose induite par gp120 en régulant l'induction de Fas ligand et en activant la voie PI3K/Akt (Anand et Ganju, 2006).

Les mécanismes et les voies d'activation régulés par le CD45 dans le processus d'apoptose sont très peu connus à ce jour. Nous avons clairement établi la preuve que le CD45 a réellement un rôle dans l'apoptose induite par des perturbateurs mitochondriaux (Desharnais *et al.*, 2008). En effet, en transfectant de façon transitoire le CD45 dans les cellules T déficientes pour l'expression du CD45, il y a rétablissement de la fragmentation de l'ADN internucléosomale au même niveau que les cellules T normales CD45+ (Desharnais *et al.*, 2008). Bien qu'il y ait absence de fragmentation de l'ADN chez les cellules CD45- nous avons préalablement démontré que la voie d'activation de l'apoptose semble être bien enclenchée (Desharnais *et al.*, 2008). En effet, suite à l'exposition des cellules CD45- au TBT il y a dissipation du potentiel mitochondrial, libération du cytochrome c, mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire, clivage de la procaspase-3, activation enzymatique de la caspase-3 ainsi que clivage du DFF45. Nous avons également démontré que le défaut de signalisation chez les cellules CD45- se

retrouve dans le cytoplasme en aval de l'activation de la caspase-3 (Desharnais *et al.*, 2008). Il a aussi été établi une implication du CD45 dans la régulation de l'apoptose nucléaire par le contrôle de l'homéostasie ionique de la cellule (Dupéré-Minier *et al.*, 2004). En effet, après induction de l'apoptose, contrairement aux cellules CD45+, les cellules CD45- détiennent une absence de réduction du volume cellulaire, une absence d'acidification intracellulaire, une absence d'exposition des résidus de phosphatidylsérine ainsi qu'une absence de phosphorylation des canaux de chlore sur les résidus tyrosine. L'exposition des cellules CD45- à un milieu hypotonique induit une fragmentation de l'ADN mais ne permet pas de rétablir une pleine fragmentation (Dupéré-Minier *et al.*, 2004). En continuité avec nos travaux antérieurs, cette thèse avait pour objectif de caractériser les événements impliqués dans l'apoptose nucléaire, gouverné directement ou indirectement par la tyrosine phosphatase CD45.

Caractérisation des facteurs de régulation de l'apoptose nucléaire selon l'expression du CD45

Chez les cellules CD45-, l'activation de la caspase-3, une caspase effectrice centrale dans l'apoptose, laisse présager l'activation de la caspase-9. La caspase-9 est la caspase initiatrice impliquée dans l'induction de l'apoptose par la voie de la mitochondrie (Ashe et Berry, 2003). En effet, suite à l'exposition au TBT, il y a clivage de la pro-caspase-9 de façon similaire chez les cellules CD45+ et CD45- (Annexe II : Figure 15). En plus de l'activation de la caspase-9, il y a également clivage de la pro-caspase-8 (Annexe II : Figure 16), une caspase initiatrice impliquée dans l'induction de l'apoptose par la voie des récepteurs de mort. Le TBT est très bien reconnu comme étant un agent induisant l'apoptose par l'activation de la voie mitochondriale (Stridh *et al.*, 1998; Nishikimi *et al.*, 2001). Toutefois, Jurkiewicz *et al.* (2004) ont démontré que chez des hépatocytes, le TBT active également la voie des récepteurs de mort. L'activation de la caspase-8 peut être le résultat de l'amplification de l'activation des caspases suite à l'activation de la caspase-9 (Viswanath *et al.*, 2001). L'inhibition de la fragmentation de l'ADN chez les cellules CD45- n'est pas due à une interaction moléculaire avec le TBT puisque ces cellules sont également résistantes à une panoplie d'inducteurs dont les rayons UV, des drogues de

chimiothérapie et la liaison du récepteur Fas par des anticorps monoclonaux (Annexe II : Figure 17). Toutefois, étant donné que l'exposition des cellules CD45⁻ à des concentrations de cycloheximide activant l'apoptose, induit une fragmentation de l'ADN, la résistance des cellules CD45⁻ est donc dépendante de la voie d'induction (Desharnais *et al.*, 2008). Étant donné que l'activation des différentes caspases se fait de façon similaire chez les cellules exprimant ou non le CD45, l'absence de fragmentation de l'ADN chez les cellules CD45⁻ ne semble pas liée à un défaut d'activation des caspases. Toutefois, après induction de l'apoptose, la caspase-3 active se situe principalement au niveau du cytoplasme chez les cellules CD45⁻ contrairement aux cellules CD45⁺ où la caspase-3 se retrouve principalement au niveau du noyau (Desharnais *et al.*, 2008). De plus, chez les cellules CD45⁻, le clivage de substrats des caspases ne se fait pas de façon identique selon la localisation du substrat (Desharnais *et al.*, 2008). En effet, XIAP, un substrat cytoplasmique, est clivé de façon similaire chez les cellules CD45⁺ et CD45⁻. Par contre, chez les cellules CD45⁻, il y a un défaut du clivage de la lamine B, un constituant de la matrice nucléaire (Desharnais *et al.*, 2008). Étant donné le défaut de clivage de la lamine B, il était important de vérifier le clivage de molécules reconnues essentielles pour obtenir une fragmentation de l'ADN. L'absence du clivage de PARP-1 et de NuMa inhibant la fragmentation de l'ADN a été rapportée dans d'autres modèles (Boulares *et al.*, 2002; West, Ji et Marnett, 2005; Lin, Hsu et Yeh, 2007). Étant donné que PARP-1 et NuMa sont clivés de façon similaire chez les cellules CD45⁺ et CD45⁻, le défaut de leur clivage n'est pas responsable de l'absence d'apoptose nucléaire chez les cellules CD45⁻.

En raison des perturbations dans la localisation nucléaire de la caspase-3 et du clivage d'un substrat nucléaire chez les cellules CD45⁻, il était intéressant de déterminer le démantèlement des pores nucléaires. L'évaluation du clivage de Tpr et de NUP153, des composants des pores nucléaires tous deux situés sur la face nucléaire, nous a permis de démontrer que le démantèlement des pores nucléaires est incomplet chez les cellules CD45⁻ induites en apoptose. Étant donné que normalement le clivage de NUP153 et de la lamine B correspond à l'initiation de la fragmentation de l'ADN (Kihlmark, Imreh et Hallberg, 2001), le défaut de leur clivage chez les cellules CD45⁻ pourrait jouer un rôle

dans l'inhibition de l'apoptose nucléaire. Le démantèlement des pores nucléaires permet l'entrée et la sortie de molécules dans le noyau qui sont impliquées dans la régulation de l'apoptose (Faleiro et Labzebnik, 2000; Kihlmark *et al.*, 2004). Malheureusement, la régulation mécanistique du démantèlement des pores nucléaires n'est pas très bien connue à ce jour. Ferrando-May *et al.* (2001) ont démontré que Tpr ainsi que NUP153 peuvent tous les deux être clivés par la caspase-3 (Ferrando-May *et al.*, 2001). Étant donné que la caspase-3 est active similairement chez les cellules CD45+ et CD45- d'autres facteurs sont responsables du défaut du clivage de NUP153 (Desharnais *et al.*, 2008). Le niveau de phosphorylation est un facteur important à considérer. En effet, le niveau de phosphorylation de certaines protéines peut influencer leur clivage par les caspases (Torres, 2003; Reyland, 2007; McDonnell *et al.*, 2008). Il a antérieurement été démontré que NUP153 peut être phosphorylée, mais les kinases responsables de cette phosphorylation n'ont pas encore été identifiées (Beausoleil *et al.*, 2004; Porter et Palmenberg, 2009). Donc, il se pourrait qu'il y ait un changement dans le niveau de la phosphorylation de NUP153 chez les cellules CD45- ce qui inhiberait son clivage par les caspases.

Étant donné que l'expression basale du DFF40 est trop faible pour détecter sa présence par immunofluorescence, la surexpression du DFF était nécessaire afin de déterminer sa localisation à l'aide de cette technique. La surexpression du complexe DFF n'induit et/ou n'augmente pas la fragmentation de l'ADN chez les cellules CD45+ et CD45- (Annexe II : Figure 18). La confirmation par immunofluorescence du défaut de la localisation nucléaire du DFF40 chez les cellules CD45- suggère une anomalie dans le transport nucléaire de ces cellules. Porter et Palmenberg (2009) ont démontré qu'une hyperphosphorylation des nucléoporines NUP62, NUP153 et NUP214 inhibe l'importation et l'exportation nucléaire. Nous avons préalablement démontré que, chez les cellules CD45-, il y a une augmentation générale du niveau de la phosphorylation de base sur les résidus tyrosines (Dupéré-Minier *et al.*, 2004). Donc, chez les cellules CD45-, le transport nucléaire pourrait être inhibé par une hyperphosphorylation de certains constituants des pores nucléaires. La phosphorylation est une modification post-traductionnelle qui peut également altérer le transport nucléaire en régulant directement

les molécules à transporter. En effet, la phosphorylation d'une molécule près d'une NLS peut inactiver la NLS et inhiber l'importation nucléaire de la molécule (Harreman *et al.*, 2004; Pemberton et Paschal, 2005). Par exemple, la phosphorylation de p53 sur sérine 315 bloque l'accessibilité de la NLS de p53 aux importines (Liang et Clarke, 2001). Suite à la co-immunoprécipitation du DFF40 chez les cellules non apoptotiques nous n'avons pas identifié de phosphorylation à l'aide de divers anticorps anti-phosphosérine/thréonine et anti-phosphotyrosine. Malgré tout, la phosphorylation du DFF40 reste toujours possible sauf que les approches expérimentales disponibles pour détecter les modifications post-traductionnelles de cette molécule sont manquantes. Une autre modification post-traductionnelle pouvant réguler directement le transport nucléaire de molécules est l'acétylation. En effet, il a été démontré que l'acétylation de molécules peut être requise pour la rétention nucléaire (Spilianakis, Papamatheakis et Kretsovali, 2000; Soutoglou, Katrakili et Talianidis, 2000). Étant donné que nous avons identifié une acétylation du DFF40 seulement chez les cellules CD45-, l'absence de la localisation nucléaire du DFF40 chez ces cellules ne peut être expliquée par ce mécanisme. Il a été démontré que la phosphorylation d'une protéine peut réguler l'acétylation de cette molécule (Wang *et al.*, 2008). En effet, la phosphorylation de p53 sur sérine 15 induit son acétylation sur lysine 320 et lysine 373/382 (Wang *et al.*, 2008). L'acétylation du DFF40 se retrouvant seulement chez les cellules CD45-, le niveau de phosphorylation du DFF40 pourrait donc être différent selon l'expression du CD45. La formation différente d'oligomères du DFF40 chez les cellules CD45- pourrait être un facteur inhibant la localisation nucléaire du DFF40. En effet, l'oligomérisation peut empêcher les interactions avec les importines et exportines en masquant les NLS (Zhu *et al.*, 1998; Liang et Clarke, 2001).

La technique BN-PAGE (pour « Blue Native-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis ») est une technique de gel natif permettant la migration de complexes de haut poids moléculaire grâce à la coloration au bleu de coomassie. En utilisant la technique BN-PAGE nous avons été les premiers à analyser la formation d'oligomères du DFF40 à l'aide de cette technique. De plus, nous avons démontré pour la première fois la formation d'oligomères de haut poids moléculaire chez des cellules normales non-

apoptotiques (CD45+) allant jusqu'à plus de 400 kDa. En effet, lorsque le DFF40 est inactif, le plus gros oligomère du DFF40 qui a été rapporté est d'environ 180 kDa qui représente un hétérotétramère ou un dimère d'hétérodimère par sa liaison avec le DFF45 (Lechardeur *et al.*, 2005). L'oligomérisation du DFF40 a déjà été étudiée à l'aide de plusieurs techniques dont par chromatographie d'exclusion stérique, par gel natif, par l'expression bactérienne de DFF recombinant ainsi que par microscopie à force atomique (Woo *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 1999; Widlak *et al.*, 2003). Étant donné que la forme du DFF40 diffère à travers les différentes études publiées, Widlak (2009) a suggéré que les divergences entre les différentes études étaient sûrement dû au niveau de la méthode d'analyse utilisée bien qu'il pourrait aussi y avoir des différences selon le type cellulaire. À l'aide de la technique de BN-PAGE, ainsi que par simple gel natif, nous avons déterminé que la formation d'oligomères du DFF40 de plus faible poids moléculaire est absente chez les cellules CD45-. Après induction de l'apoptose, le DFF40 forme des oligomères de plus faible poids moléculaire chez les cellules CD45-. La phosphorylation et l'acétylation sont deux mécanismes qui peuvent être nécessaires pour la régulation de l'oligomérisation de certaines protéines (Kawaguchi *et al.*, 2006; Eberle *et al.*, 2007). Par exemple, la phosphorylation de Fas sur résidus tyrosine est nécessaire pour son oligomérisation (Eberle *et al.*, 2007). Quant au facteur de transcription p53 qui détient plusieurs modifications post-traductionnelles, il a été déterminé que son acétylation sur lysine régule son oligomérisation (Kawaguchi *et al.*, 2006). L'acétylation du DFF45 ainsi que du DFF35 chez les cellules CD45+ et CD45- pourrait donc être un mécanisme qui régule la formation des complexes DFF40/DFF45, DFF40/DFF35. L'absence de la phosphorylation sur les résidus tyrosine du DFF45 chez les cellules CD45-, pourrait inhiber la formation de complexes DFF de faible poids moléculaire. De plus, l'acétylation du DFF40 chez les cellules CD45- pourrait également inhiber la formation de complexes DFF de faible poids moléculaire en favorisant la formation d'oligomères de plus haut poids moléculaire. L'évaluation des modifications post-traductionnelles du DFF40 après induction de l'apoptose n'a pas été analysée. En effet, l'immunoprécipitation directe du DFF40 n'a pu être possible. À notre connaissance, il n'existe pas d'anticorps immunoprécipitant à ce jour. Il est possible que l'encombrement stérique ainsi que la formation d'oligomères puisse empêcher l'immunoprécipitation du DFF40. Par contre,

étant donné que la localisation du DFF40 a été possible par immunofluorescence, l'instabilité du DFF40 lors de son immunoprécipitation pourrait plutôt être responsable de l'absence de sa précipitation. En effet, même l'immunoprécipitation du DFF40 couplée à une molécule de reconnaissance (« tag ») n'a pas été possible. L'impossibilité d'immunoprécipiter le DFF40 couplé à un « tag » est sûrement spécifique à notre type cellulaire étant donné que Lechardeur, Xu et Lukacs (2004) ont immunoprécipité le DFF40 chez des cellules HeLa. Le développement de nouveaux anticorps ou la construction de nouvelles molécules chimères, avec un « tag » différent ou localisé dans une autre région de la molécule DFF40, pourrait nous permettre d'identifier les différentes modifications post-traductionnelles régulant le DFF40 et les changements de ces modifications selon l'expression du CD45.

Après l'analyse du DFF40 par gel dénaturant nous avons identifié pour la première fois différentes formes du DFF40. Ces différentes formes du DFF40 semblent être dues aux différentes modifications post-traductionnelles. Après induction de l'apoptose, le DFF40 semble perdre des modifications post-traductionnelles chez les cellules CD45⁺ et CD45⁻ étant donné l'apparition de bandes de plus faible poids moléculaire. Le DFF40 détient sûrement des modifications post-traductionnelles qui sont perdues lors de l'étape avancée de l'apoptose. La perte de ces modifications pourrait être un moyen de désactivation du DFF40 ce qui protégerait les cellules voisines contre une attaque par cette nucléase activée. Contrairement aux cellules CD45⁺, chez les cellules CD45⁻ non-apoptotiques, le DFF40 est exprimé sous deux formes. Étant donné qu'après induction de l'apoptose, le DFF40 est exprimé sous trois formes chez les cellules CD45⁻, contrairement à deux chez les cellules CD45⁺, le DFF40 semble détenir une perturbation des modifications post-traductionnelles chez les cellules CD45⁻. Cette perturbation du DFF40 provient probablement d'une régulation directe du CD45 ou bien par une régulation indirecte du CD45 par des substrats en aval du CD45. Les différentes modifications post-traductionnelles du DFF40 chez les cellules CD45⁻ pourraient être causées par une localisation cytoplasmique au lieu de nucléaire ainsi que par une oligomérisation différente du DFF40 chez ces cellules. En effet, un changement dans la localisation et dans l'oligomérisation du DFF40 pourrait rendre le DFF40 plus ou moins accessible à

certaines molécules régulatrices. Le DFF40 est une molécule riche en résidus lysine, tyrosine, sérine et thréonine (Mukae *et al.*, 1998). Donc, il ne serait pas surprenant que l'acétylation et la phosphorylation régulent l'activité et le processus fonctionnel du DFF40. Mise à part la phosphorylation et l'acétylation le DFF40 pourrait être sujet à plusieurs autres types de modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, la palmitoylation et la sumoylation qui sont associées à la régulation de la localisation nucléaire, à l'oligomérisation et à l'activation fonctionnelle de molécules (Snow et Hart, 1998; Besnault-Mascard *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008).

Caractérisation de l'implication de molécules en aval du CD45 et d'événements impliqués dans l'apoptose nucléaire.

Étant donné que le CD45 est un important régulateur de voies de signalisation, il était important de vérifier l'implication de molécules en aval du CD45 dans l'apoptose. Il a été déterminé que la protéine tyrosine kinase p56lck, le principal substrat du CD45, est hyperphosphorylée en absence de l'expression du CD45 et que l'activité de cette kinase est augmentée en absence du CD45 (D'Oro et Ashwell, 1999). Étant donné que la p56lck se retrouve en amont des trois principales voies de signalisation du TCR (MAPKs, PI3K/Akt et PKC), il n'est pas surprenant que nous ayons identifiées une augmentation de l'activité de ces voies de signalisation chez les cellules CD45-. Les MAPKs p38, Erk-1/-2 et JNK ont souvent été identifiés comme ayant un rôle dans la régulation de l'apoptose. Malheureusement, le rôle de ces MAPKs dans l'apoptose est très controversé. En effet, leurs implications dans l'apoptose est différentes selon le type cellulaire et selon l'inducteur de l'apoptose utilisé. Par exemple, Chen *et al.* (2009) ont déterminé que l'activation de la kinase p38 est essentielle dans l'apoptose induite par le cuivre chez des neurones. Ivanov et Ronai (2000), quant à eux, ont déterminé que l'activation de la kinase p38 protège contre l'apoptose induite par des rayons UV chez des cellules du mélanome. Donc le rôle spécifique de chacune des MAPKs peut être soit anti- ou pro-apoptotique, dépendamment de l'étude. Puisque l'activation de p38 est augmentée chez les cellules CD45-, il était intéressant de vérifier le niveau de phosphorylation de STAT1. Le facteur de transcription STAT1 est impliqué dans l'apoptose par l'expression de gènes

anti- et pro-apoptotiques (Stephanou et Latchman, 2003). Il a été démontré que p38 régule l'activation de STAT1 (Kovarik *et al.*, 1999). Malgré l'augmentation de l'activation de p38 chez les cellules CD45-, les niveaux de phosphorylation de STAT1 sont similaires chez les cellules CD45+ et CD45- (Annexe II : Figure 19). Donc, STAT1 ne serait pas responsable de l'absence d'apoptose nucléaire chez les cellules déficientes pour l'expression du CD45.

Le proto-oncogène Akt est un bon candidat responsable de l'inhibition de l'apoptose nucléaire chez les cellules CD45-. Bien que sa localisation nucléaire n'est pas augmentée, son activité est supérieure chez les cellules CD45- et Akt est partiellement clivé chez ces cellules. Un défaut de son clivage n'est pas surprenant étant donné que nous avons déjà rapporté un défaut du clivage de la lamine B chez les cellules CD45- (Desharnais *et al.*, 2008). Il a été démontré que la phosphorylation de Akt peut inhiber son clivage (Jahani-Asl, Basak et Tsang, 2007). Donc, l'augmentation de l'activité de Akt peut être responsable de son clivage partiel chez les cellules CD45- induites en apoptose. Malgré l'augmentation de l'activité de Akt chez les cellules CD45-, l'inhibiteur de la voie PI3K/Akt n'a pas rétabli la fragmentation de l'ADN. Toutefois, Akt pourrait toujours avoir un rôle dans la résistance des cellules CD45- en concomitance avec d'autres molécules suractivées. La PKC δ est une kinase multifonctionnelle impliquée dans la prolifération ainsi que dans la mortalité cellulaire (Reyland, 2007). Son rôle dans l'apoptose a été démontré par l'expression d'un mutant de PKC δ où l'activité kinase est absente ce qui inhibe l'apoptose induite par plusieurs stimuli (Matassa *et al.*, 2001). Plusieurs substrats de PKC δ ont été identifiés comme par exemple certains facteurs de transcription, des protéines de structures ainsi que d'autres protéines kinases (Reyland, 2007). Malheureusement, la régulation de l'apoptose par PKC δ n'est pas encore bien établie. Étant donné que PKC δ semble sous une forme constitutivement active chez les cellules CD45-, l'absence d'apoptose nucléaire chez ces cellules n'est probablement pas reliée à cette kinase. Lors de l'apoptose, la formation d'un fragment actif (δ CF) par la caspase-3 est précédée par la phosphorylation de PKC δ (Reyland, 2007). L'hyperphosphorylation de PKC δ chez les cellules CD45- pourrait favoriser le clivage de PKC δ chez les cellules CD45- en prolifération. Il a été démontré que les membres de la

famille PKC peuvent être clivés par une variété de protéases comme des sérines-protéases et des protéases dépendantes du calcium (Nishizuka, 1988; Hashimoto et Yamamura, 1989; Houslay, 1991; Kramer et Sharp, 1997; Hussain *et al.*, 2002; Anantharam *et al.*, 2002; Persaud *et al.*, 2003). L'inhibition de PKC δ par un inhibiteur global des PKCs inhibe la fragmentation de l'ADN chez les cellules CD45+ démontrant son rôle pro-apoptotique. De plus, le clivage de Ebp1 n'est pas requis dans notre modèle. Donc, le clivage de Ebp1 doit être spécifique au type cellulaire. En effet, les études portant sur l'importance du clivage de Ebp1 dans l'apoptose ont été effectuées chez les cellules PC12 qui sont des cellules neuronales (Ahn *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006).

La production de ROS est connue comme pouvant activer certaines voies de signalisation comme la voie des MAPKs, Akt et NF- κ B (Schreck, Rieber et Baeuerle, 1991; Ushio-Fukai *et al.*, 1999; Yoshizumi *et al.*, 2000; Jia *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008). L'activité des MAPKs, de Akt ainsi que de NF- κ B est augmentée chez les cellules CD45- après induction de l'apoptose. Étant donné qu'il y a une diminution de la production de ROS chez ces cellules, la génération de ROS n'est probablement pas responsable de l'augmentation de l'activité de ces voies de signalisation. À ce jour, il n'est pas encore clairement établi comment la production de ROS est régulée lors de l'apoptose ni la réelle implication de ROS dans le processus de l'apoptose. Toutefois, il est connu que les ROS sont principalement produits par la mitochondrie et un excès de cette production cause un stress oxydatif avec une augmentation de l'activité antioxydante du système de défense et des dommages mitochondriaux (Fleury, Mignotte et Vayssiere, 2002). Il a déjà été démontré que la production de ROS peut agir en amont de la dépolarisation membranaire mitochondriale et de la libération du cytochrome c (Sidoti-de Fraise *et al.*, 1998; Morita-Fujimura *et al.*, 2000). Dans notre modèle, l'inhibition de la production de ROS chez les cellules CD45-, n'interfère pas avec l'initiation de l'apoptose au niveau de la mitochondrie puisqu'il y a dissipation du potentiel mitochondrial ainsi que libération du cytochrome c (Desharnais *et al.*, 2008). Il a été démontré que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 peut protéger les cellules contre l'apoptose en changeant le niveau d'oxydoréduction vers un état plus réduit (Steinman, 1995; Sidoti-de Fraise *et al.*, 1998). Étant donné que les niveaux d'expression de Bcl-2 sont similaires chez les cellules

CD45⁺ et CD45⁻, l'inhibition de la production de ROS chez les cellules CD45⁻ n'est donc pas causée par une diminution de l'expression de Bcl-2. L'inhibition de la production de ROS pourrait influencer la phase exécutive de l'apoptose par l'oxydation de molécules importante pour l'apoptose nucléaire. L'inhibition de la production de ROS dans l'apoptose n'est pas encore bien connue. Toutefois, puisqu'il y a une hyperphosphorylation de protéines chez les cellules CD45⁻ (Desharnais *et al.*, 2008), il pourrait y avoir un défaut dans la phosphorylation de molécules impliquées dans la production de ROS. Par exemple, le cytochrome c a récemment été identifié comme pouvant être phosphorylé et sa phosphorylation sur le résidu tyrosine 48 inhibe la respiration mitochondriale (Lee *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008).

Étant donné que les trois principales voies de signalisation (MAPKs, Akt et PKC) semble hyperactivées chez les cellules CD45⁻ après exposition au TBT, il n'est pas surprenant que la synthèse de l'ARN messager (Annexe II : Figure 20) ainsi que l'activation de NF- κ B est augmentées. Une autre étude a rapporté une activation constitutive de NF- κ B chez les cellules CD45⁻ HPB45.0 lors de l'infection au VIH-1 (Baur, Garber et Peterlin, 1994). NF- κ B peut induire l'apoptose en augmentant l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Fas, FaL, c-Myc et il peut également agir comme un facteur de survie en augmentant l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-xL et c-IAP-1/2 (Barkett et Gilmore, 1999). Il a été rapporté qu'une activation constitutive de NF- κ B stimule l'expression d'oncogènes et induit une tumorigenèse (Rayet et Gelinas, 1999). Dans notre modèle, l'inhibition de l'activation de NF- κ B chez les cellules CD45⁻ n'a pas rétabli l'apoptose nucléaire. Étant donné que chez les cellules CD45⁻ la synthèse d'ARN messager est augmentée et l'activation de NF- κ B est diminuée durant l'incubation à l'inducteur de l'apoptose, d'autres facteurs de transcriptions doivent être suractivés chez ces cellules. L'inhibition partielle de la fragmentation de l'ADN chez les cellules CD45⁺ par l'inhibiteur de l'activation de NF- κ B provient sûrement de l'inhibition de NF- κ B au début de l'induction de l'apoptose ce qui démontre le rôle pro-apoptotique de NF- κ B.

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de kinases n'a pas rétabli l'apoptose nucléaire chez les cellules CD45⁻. L'absence de l'apoptose nucléaire chez ces cellules est sûrement due

à une combinaison de l'augmentation de l'activité de plusieurs molécules. L'utilisation d'inhibiteurs généraux de protéines kinases, comme la génistéine, inhibe l'apoptose chez les cellules CD45⁺ démontrant toutefois que certaines kinases sont impliquées et essentielles à l'activation de l'apoptose (Dupéré-Minier *et al.*, 2004). L'activation de protéines kinases, l'augmentation de la synthèse d'ARN messager et l'activation de NF- κ B suggèrent une augmentation de protéines pro-apoptotiques inhibant l'apoptose chez les cellules CD45⁻. De plus, le niveau d'acétylation totale des histones est plus élevé chez les cellules CD45⁻, comparativement aux cellules CD45⁺ (Annexe II : Figure 21). Ce niveau d'acétylation plus élevé laisse présager une augmentation de la transcription de protéines anti-apoptotiques chez ces cellules. Les inhibiteurs des histones déacétylases (HDAC) peuvent rétablir l'apoptose chez des cellules tumorales en rétablissant la synthèse de gènes pro-apoptotiques (Emanuele, Lauricella et Tresosiere, 2008). L'utilisation d'inhibiteurs de HDAC peut être un moyen pour bloquer une augmentation possible de l'expression de gènes anti-apoptotiques. Toutefois, l'exposition des cellules CD45⁻ à des inhibiteurs de HDAC ne rétablit pas l'apoptose nucléaire (Annexe II : Figure 22) suggérant que l'augmentation de l'activation des voies de signalisation chez les cellules CD45⁻ inhiberait plutôt des mécanismes intramoléculaires impliqués dans la régulation de l'apoptose nucléaire comme la régulation du DFF40.

CONCLUSION

En conclusion, les travaux de cette thèse ont démontré que l'absence de l'expression du CD45 chez les cellules T perturbe la régulation du DFF40 et augmente l'activation de molécules en aval de la voie de signalisation du CD45. Contrairement aux cellules CD45+, les cellules CD45- sont résistantes à l'apoptose nucléaire induite par des perturbateurs mitochondriaux. Nous avons démontré que chez les cellules CD45-, il y a un défaut du démantèlement des pores nucléaires. Après la surexpression du DFF40, nous avons confirmé par immunofluorescence la perturbation de sa localisation nucléaire chez les cellules CD45-. Nous avons démontré par BN-PAGE que l'oligomérisation du DFF40 diffère selon l'expression du CD45. Nous avons établi que le DFF40 est exprimé sous différentes formes qui diffèrent selon l'expression du CD45. Nous avons identifié pour la première fois des modifications post-traductionnelles chez le complexe DFF qui peuvent être modifiées selon l'expression du CD45. Nous avons également démontré qu'en absence du CD45 il y a inhibition de la production de ROS. De plus, nous avons montré qu'il y a une augmentation de l'activité de protéines kinases en aval du CD45 et une activation constitutive de NF- κ B. La figure 14 résume les événements durant l'apoptose chez les cellules T ayant perdu l'expression du CD45. L'absence d'apoptose nucléaire chez les cellules CD45- semble impliquer plusieurs molécules en aval du CD45 qui perturberaient les mécanismes de régulation de l'apoptose nucléaire.

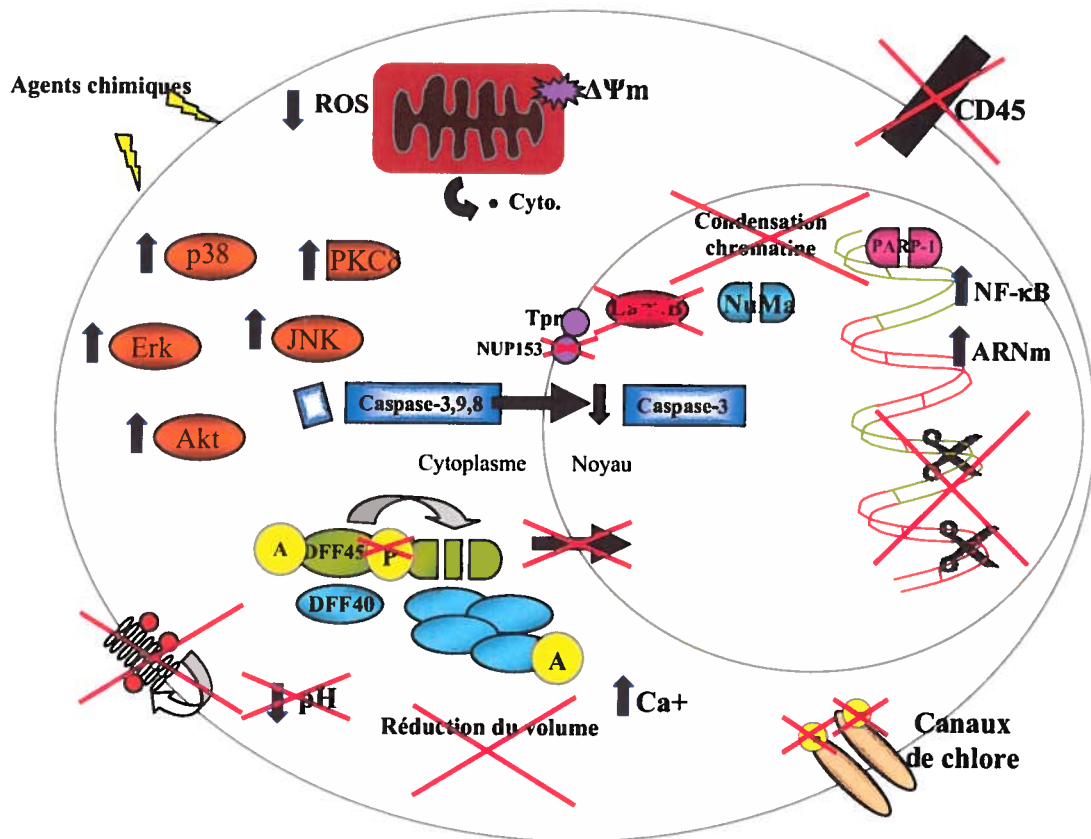


Figure 14 : Événements caractérisant les cellules CD45- après induction de l'apoptose par des agents perturbant la mitochondrie. Voici les événements se déroulant suite à l'induction de l'apoptose par des agents perturbant la mitochondrie chez les cellules T ayant perdues l'expression du CD45 : perturbation de la perméabilité mitochondriale, libération du cytochrome c, mobilisation du calcium, diminution de la production de ROS, activation de la caspase-3,-8 et -9, défaut de la localisation nucléaire de la caspase-3, clivage de PARP-1, augmentation de la phosphorylation de protéines kinases (p38, JNK, Erk, PKC δ et Akt), augmentation de la synthèse d'ARNm, augmentation de l'activation de NF- κ B, absence d'exposition des PS, absence d'acidification intracellulaire, absence de réduction du volume cellulaire, absence de phosphorylation sur les résidus tyrosine des canaux de chlore, clivage de Tpr, défaut du clivage de NUP153, défaut du clivage de la lamine B, clivage de NuMa, clivage du DFF45, acétylation du DFF45, absence de la phosphorylation du DFF45, acétylation du DFF40, formation d'homo-oligomères du DFF40 de plus haut poids moléculaires, défaut de la localisation nucléaire du DFF40, absence de la condensation de la chromatine, absence de la fragmentation internucléosomale de l'ADN.

PERSPECTIVES

Deux rôles ont été proposés à la nécessité d'avoir une fragmentation internucléosomale de l'ADN lors de l'apoptose. En premier lieu, la fragmentation de l'ADN réduit le risque de transférer de l'informations génétiques à d'autres cellules voisines (de la Taille *et al.*, 1999). Deuxièmement, la fragmentation internucléosomale de l'ADN lors de l'apoptose diminue la production d'auto-anticorps contre l'hétérochromatine associée à des maladies auto-immunes (Nagata, 2000). Il a été démontré que l'expression du CD45 est perdue dans plus de 10% des patients avec une leucémie aigüe lymphoblastique (Ratei *et al.*, 1998). L'expression de la phosphatase CD45 est aussi fréquemment perdue chez des patients ayant un lymphome de Hodgkin et/ou un myélome multiple (Ozdemirli *et al.*, 1996; Ishikawa *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2005). De plus, des patients avec un myélome multiple qui ont perdu l'expression du CD45 ont un taux de survie plus court que des patients avec un myélome multiple CD45+ (Asosingh *et al.*, 2003). Puisque les lymphomes CD45- n'ont pas de fragmentation de l'ADN, il y a une plus grande chance chez ces cellules de transférer de l'information génétique à des cellules saines voisines, ce qui peut augmenter la progression de la leucémie. Ce projet d'étude a donc une grande importance au niveau du traitement de leucémies. En effet, en étudiant les mécanismes de résistance à l'apoptose des cellules déficientes pour l'expression du CD45, une thérapie pourrait éventuellement être développée afin de renverser la résistance de ces cellules aux traitements de chimiothérapie. Le rétablissement de la sensibilité des cellules CD45- à l'apoptose pourrait être par la réexpression du gène du CD45 ou par l'inhibition de protéines cibles causant la résistance à l'apoptose. Une telle thérapie pourrait augmenter grandement les chances de survie des patients ayant perdu l'expression du CD45 et serait une grande avancée dans le monde de la médecine.

En perspectives, il serait intéressant de déterminer toutes les modifications post-traductionnelles possibles chez le DFF40 afin de déterminer l'influence de l'expression du CD45 sur cette endonucléase. Toutefois, la technologie d'aujourd'hui ne nous permet pas d'évaluer ces modifications chez le DFF40 endogène activé. Toutefois, il serait très intéressant de vérifier l'implication des modifications post-traductionnelles du DFF40 dans l'apoptose nucléaire par mutagenèse dirigée. La phosphorylation sur les résidus sérine, thréonine et/ou tyrosine ainsi que l'acétylation sur les résidus lysine du DFF40

pourrait être étudiées par la technique de mutagenèse dirigée. Puisqu'il n'est possible d'immunoprécipiter le DFF40, il n'est pas possible d'ont plus de le faire séquencer pour connaître les sites détenant des modifications post-traductionnelles. Donc, la technique de mutagenèse dirigée serait malheureusement effectuée de façon très aléatoire. Bien qu'il n'y a pas encore d'anticorps de disponible sur le marché, il serait également intéressant de déterminer le niveau de phosphorylation de NUP153 chez les cellules CD45+ et CD45- pour déterminer si le défaut de son clivage chez les cellules CD45- est causé par son hyperphosphorylation. Pour évaluer si le transport nucléaire est inhibé chez les cellules ayant perdu le CD45, il serait intéressant de transférer un plasmide GFP-NLS et de suivre par microscopie à fluorescence sa localisation chez les cellules au repos ainsi qu'après induction de l'apoptose.

Il serait aussi intéressant de déterminer l'implication plus spécifique des différentes kinases en aval du CD45 dans la résistance de l'apoptose nucléaire. Des ARN interférant pourrait être utilisés afin de diminuer la traduction de certaines kinases chez les cellules CD45- et par la suite évaluer l'inhibition de l'apoptose nucléaire chez ces cellules. Étant donné que plusieurs kinases sont activées chez les cellules CD45-, l'inhibition simultanée de plusieurs kinases serait nécessaire. Pour prouver que les différentes kinases activées sont directement impliquées dans l'absence d'apoptose nucléaire chez les cellules CD45-, il serait intéressant de transférer le CD45 chez les cellules CD45- et de vérifier le rétablissement des différents patrons de phosphorylation. Après la transfection du CD45, des gels 2-D pourraient également être effectués et les protéines détenant un changement pourraient être séquencées par la suite pour confirmer les protéines ayant une implication dans l'apoptose nucléaire. Il serait également fort intéressant de déterminer la synthèse des gènes anti- et pro-apoptotiques chez les cellules CD45+ et CD45- par microréseau «microarray». L'augmentation de l'activation de voies de signalisation en aval du CD45 chez les cellules CD45- laisse présager une augmentation globale de la synthèse de gènes chez ces cellules. L'activation constitutive du facteur de transcription NF- κ B chez les cellules CD45- démontre la possibilité d'une augmentation de la synthèse de gènes lors de l'absence de l'expression du CD45. Une augmentation de la synthèse de gènes anti-apoptotiques (par exemple, certains membres de la famille de Bcl-2 et des membres de la

famille IAP) et/ou une diminution de gènes pro-apoptotiques (par exemple, certaines caspases ou p53) pourraient contribuer à la résistance des cellules CD45- à détenir de l'apoptose nucléaire. L'identification des molécules, directement ou indirectement régulées par le CD45, impliquées dans la régulation de l'apoptose permettra à plus long terme de développer de nouvelles approches pour traiter les patients leucémiques ayant perdue l'expression de la tyrosine phosphatase CD45.

ANNEXE I

Article scientifique supplémentaire

Contributions à l'article

J'ai effectué les expériences avec le TBT et la cycloheximide (Figure 2B), l'expérience sur l'évaluation de la fragmentation de l'ADN *in vitro* (Figure 6B) ainsi que les expériences sur l'évaluation du clivage des protéines cytoplasmiques et nucléaires (Figure 8B). J'ai également effectué les expériences sur deux figures discutées dans l'article mais non présentées (« Data not shown ») c'est-à-dire les niveaux d'expression du DFF40 et du DFF45 chez les cellules CD45+ et CD45-. J'ai également effectué les expériences sur l'activation de la caspase-9 qui a été présentée comme un autre résultat non montré (« Data not shown ») dans la discussion. J'ai participé à la rédaction de l'article ainsi qu'à la correction de l'article.

Résumé français

Le CD45 est une molécule transmembranaire de type I avec une activité phosphatase. Le CD45 représente jusqu'à 10% de toutes les glycoprotéines de surface chez les cellules hématopoïétiques nucléées. Nous avons préalablement démontré l'absence d'apoptose nucléaire chez les cellules T déficientes pour l'expression du CD45 après induction de l'apoptose par des agents chimiques. Le but de cette étude était de caractériser le rôle du CD45 dans l'apoptose nucléaire. Contrairement aux cellules T normales CD45+, les cellules T CD45- sont résistantes à l'induction de la fragmentation de l'ADN et de la condensation de la chromatine suite à l'exposition au TBT ou au H₂O₂ à l'opposé de l'exposition à la cycloheximide. La transfection du CD45 chez les cellules CD45- a rétabli la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN après exposition au TBT. Chez les deux lignées cellulaires CD45+ et CD45-, l'exposition au TBT a induit une mobilisation du calcium intracellulaire, l'activation de la caspase-3 et le clivage du DFF45. De plus, la fragmentation de l'ADN a été induite par le TBT chez les cellules déficientes pour l'expression de p56lck, ZAP-70 et SHP-1. La séparation des différentes fractions cellulaires a démontré une diminution de la localisation nucléaire de la caspase-3 et du DFF40 chez les cellules CD45-. Ces résultats démontrent pour la première fois que le CD45 joue un rôle clé dans la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine lors du processus de l'apoptose. L'activité du CD45 ou l'activité de ses substrats semble être localisée en aval de l'activation de la caspase-3 et joue un rôle dans la rétention du DFF40 dans le noyau.

Involvement of CD45 in DNA Fragmentation in Apoptosis Induced by
Mitochondrial Perturbing Agents.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Apoptosis. 2008 Feb;13(2):197-212.

<http://dx.doi.org/10.1007/s10495-007-0162-9>

Involvement of CD45 in DNA fragmentation in apoptosis induced by mitochondrial perturbing agents.

Desharnais P, Dupéré-Minier G, Hamelin C, Devine P, Bernier J.

ANNEXE II

Résultats supplémentaires

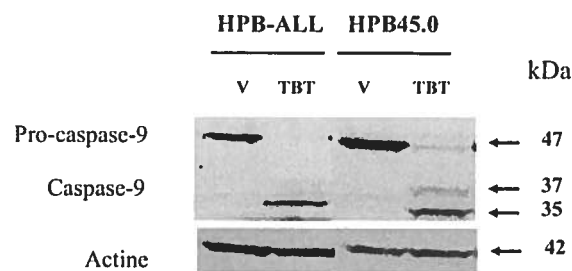


Figure 15 : La pro-caspase-9 est clivée de façon similaire chez les cellules CD45+ et CD45-. Après 4 heures d'exposition à 0.8 μM de TBT, les cellules (1×10^6) CD45+ (HPB-ALL) et CD45- (HPB45.0) ont été récoltées et resuspendues dans du tampon Laemmli. Les échantillons ont ensuite été chargés sur un gel de polyacrylamide 10% avant d'être transférés sur une membrane de nitrocellulose. La détection du clivage de la pro-caspase-9 a été effectuée à l'aide d'un anticorps anti-caspase-9. La membrane a ensuite été réhybridée avec un anticorps anti-actine afin de vérifier le chargement des échantillons dans chacun des puits. (V pour véhicule, ETOH 0.1%)

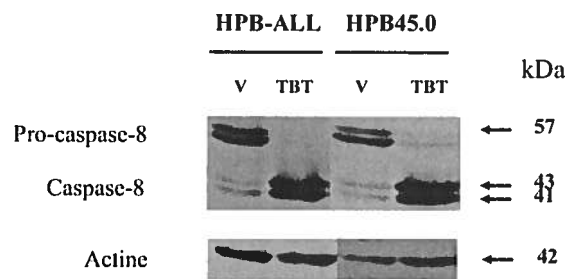


Figure 16 : La pro-caspase-8 est clivée de façon similaire chez les cellules CD45+ et CD45-. Après 4 heures d'exposition à 0.8 μ M de TBT, les cellules (1×10^6) CD45+ (HPB-ALL) et CD45- (HPB45.0) ont été récoltées et resuspendues dans du tampon Laemmli. Les échantillons ont ensuite été chargés sur un gel de polyacrylamide 10% avant d'être transférés sur une membrane de nitrocellulose. La détection du clivage de la pro-caspase-8 a été effectuée à l'aide d'un anticorps anti-caspase-8. La membrane a ensuite été réhybridée avec un anticorps anti-actine afin de vérifier le chargement des échantillons dans chacun des puits. (V pour véhicule, ETOH 0.1%)

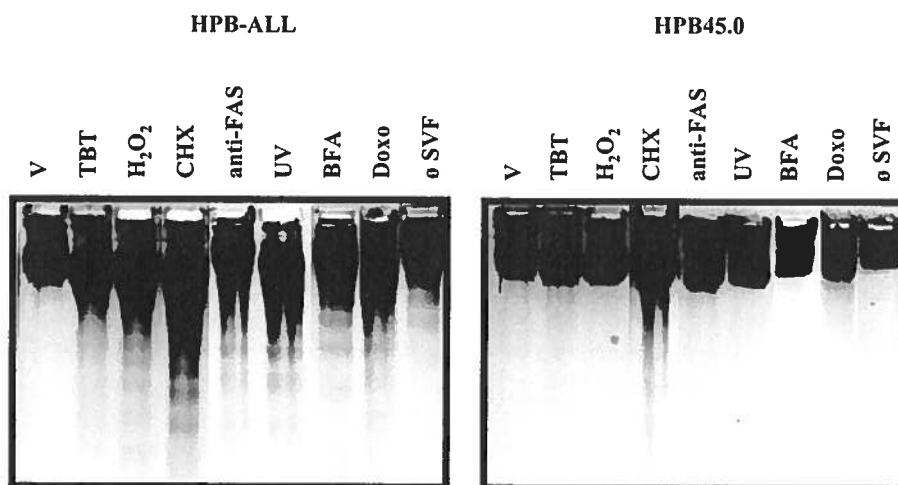


Figure 17 : Les cellules CD45- sont résistantes à l'apoptose nucléaire induite par une variété d'inducteurs sauf suite à une exposition à la cycloheximide. Les cellules CD45+ (HPB-ALL) et CD45- (HPB45.0) ont été exposées soit à 0.8 μ M de TBT pendant 4 heures, à 250 μ M de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pendant 6 heures, à 30 μ g/ml de cycloheximide (CHX) pendant 6 heures, à un anticorps anti-Fas pendant 6 heures (0.5 μ g/ml), 1 minute à des rayons UV puis incubées pendant 6 heures, à 0.5 μ g/ml de brefeldine A (BFA) pendant 24 heures, à 750 nM de doxorubicine (Doxo) pendant 24 heures ou privées de facteurs de croissance pendant 48 heures (ØSVF pour absence de sérum de veau foetale). Par la suite les cellules ont été récoltées et lysées dans un tampon de lyse contenant 0.1 mg/ml de protéinase K. Après incubation pendant 16 heures à 50°C, la protéinase K a été désactivée 10 minutes à 70°C. Les lysats ont par la suite été traités avec 0.5 mg/ml de ARNase pendant 2 heures à 37°C. Les échantillons ont été migrés dans un gel d'agarose de 2.5% à 100 V. La fragmentation de l'ADN a été évaluée après coloration au bromure d'éthidium et visualisée sous transillumination UV. (V pour véhicule, ETOH 0.1 %)

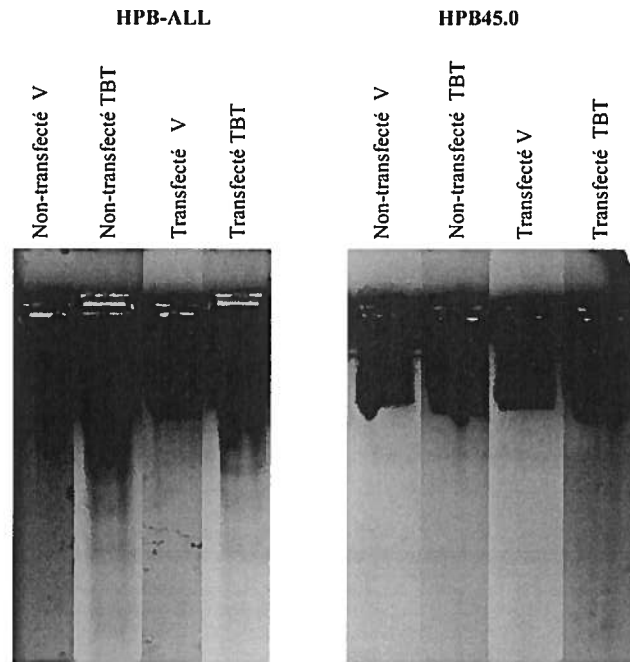


Figure 18: La surexpression du complexe DFF n'induit pas de fragmentation de l'ADN chez les cellules CD45+ et CD45-. Des lignées stables, CD45+ (HPB-ALL) et CD45- (HPB45.0), surexprimant le DFF40 ont été générées par la transfection du vecteur pcDNA3-hCAD à l'aide de la Lipofectamine™ et par la sélection à l'aide de 1.5 mg/ml de G418. Après la génération de lignées stables, le DFF45 encodé dans le plasmide pCMV-AC a été co-transfecté à l'aide de la Lipofectamine™. Après 48 heures d'incubation, les cellules transfectées ainsi que des cellules contrôles non transfectées (1×10^6) ont été exposées pendant 4 heures à 0.8 μ M de TBT. Par la suite, les cellules ont été récoltées et lysées dans un tampon de lyse contenant 0.1 mg/ml de protéinase K. Après incubation pendant 16 heures à 50°C, la protéinase K a été désactivée 10 minutes à 70°C. Les lysats ont par la suite été traités avec 0.5 mg/ml de ARNase pendant 2 heures à 37°C. Les échantillons ont été migrés dans un gel d'agarose de 2.5% à 100 V. La fragmentation de l'ADN a été évaluée après coloration au bromure d'éthidium et visualisée sous transillumination UV (V pour véhicule, ETOH 0.1%).

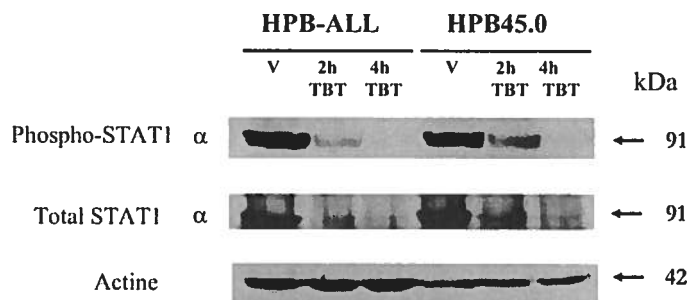


Figure 19 : Le niveau de phosphorylation de STAT1 est similaire chez les cellules CD45+ et CD45-. Après 4 heures d'exposition à 0.8 μ M de TBT, les cellules (1×10^6) CD45+ (HPB-ALL) et CD45- (HPB45.0) ont été récoltées et resuspendues dans du tampon Laemmli. Les échantillons ont ensuite été chargés sur un gel de polyacrylamide 7.5% avant d'être transférés sur une membrane de nitrocellulose. La phosphorylation de STAT1 a été déterminée à l'aide d'un anticorps anti-phospho-STAT1. La membrane a ensuite été réhybridée avec un anticorps anti-STAT1 total et un anti-actine afin de vérifier le chargement des échantillons dans chacun des puits. (V pour véhicule, ETOH 0.1%)

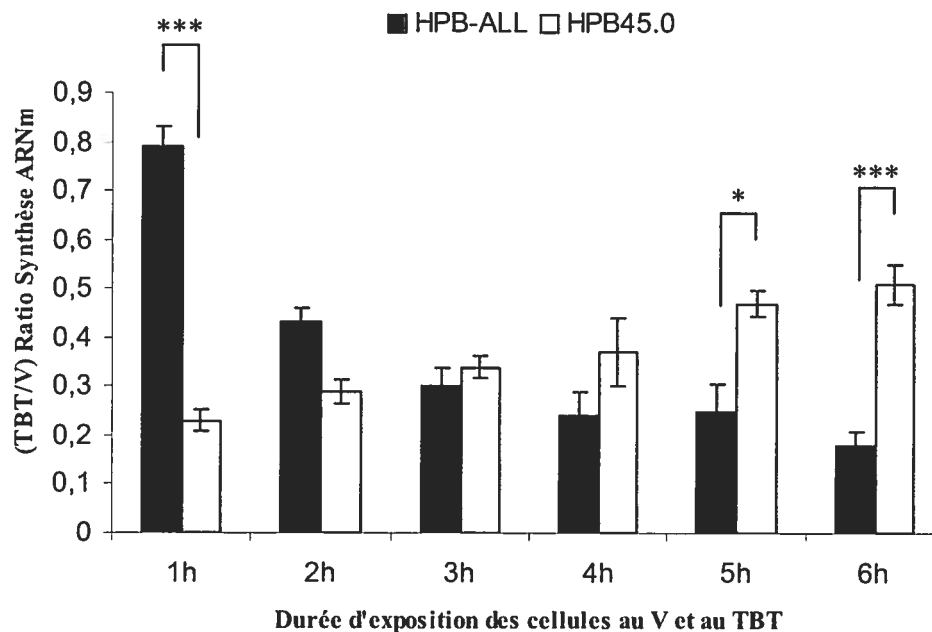


Figure 20 : Contrairement aux cellules CD45+, il y a augmentation de la synthèse d'ARN messager durant l'exposition au TBT chez les cellules CD45-. Avant l'exposition au TBT, 1 μ Ci 5-[³H]-uridine a été ajouté aux cellules. Après 6 heures d'exposition à 0.8 μ M de TBT, les cellules (2X10⁵) CD45+ (HPB-ALL) et CD45- (HPB45.0) ont été récoltées. L'incorporation d'uridine tritiée a été évaluée après chaque heure d'incubation. La synthèse de l'ARNm a été calculée comme le ratio de la synthèse d'ARNm suite à l'exposition au TBT / la synthèse d'ARNm suite à l'exposition au véhicule. Le ratio ARNm est la moyenne \pm S.E.M de trois expériences différentes (* P < 0.05, *** P < 0.001). Les données ont été analysées par one-way ANOVA avec le Tukey comparison test en utilisant le programme GraphPad InStat 3.05. (V pour véhicule, ETOH 0.1%)

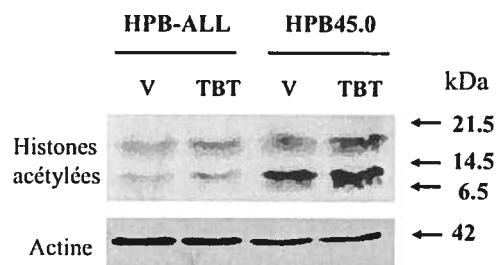


Figure 21 : L'acétylation des histones est plus élevée chez les cellules CD45-comparativement aux cellules CD45+. Après 4 heures d'exposition à 0.8 μ M de TBT, les cellules (1×10^6) CD45+ (HPB-ALL) et CD45- (HPB45.0) ont été récoltées et resuspendues dans du tampon Laemmli. Les échantillons ont ensuite été chargés sur un gel de polyacrylamide 15% avant d'être transférés sur une membrane de nitrocellulose. L'acétylation des histones a été déterminée à l'aide d'un anticorps anti-lysine acétylée. La membrane a ensuite été réhybridée avec un anticorps anti-actine afin de vérifier le chargement des échantillons dans chacun des puits. (V pour véhicule, ETOH 0.1%)

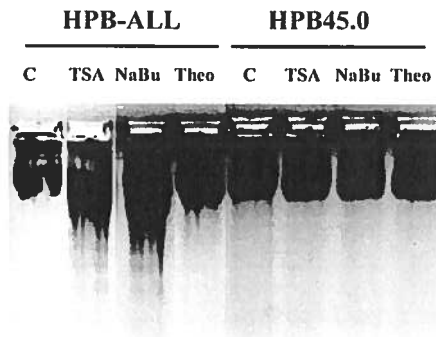


Figure 22 : Les cellules CD45- sont résistantes à l'apoptose nucléaire suite à l'induction de l'apoptose par des inhibiteurs de HDAC. Les cellules CD45+ (HPB-ALL) et CD45- (HPB45.0) ont été exposées pendant 24 heures à deux inhibiteurs de HDAC soit la trichostatine A (TSA, 0.1 μ M) et le butyrate de sodium (NaBu, 3 mM) ainsi qu'à un activateur de HDAC la théophylline (Theo, 1 μ M). Par la suite les cellules ont été récoltées et lysées dans un tampon de lyse contenant 0.1 mg/ml de protéinase K. Après incubation pendant 16 heures à 50°C, la protéinase K a été désactivée 10 minutes à 70°C. Les lysats ont par la suite été traitée avec 0.5 mg/ml de ARNase pendant 2 heures à 37°C. Les échantillons ont été migrés dans un gel d'agarose de 2.5% à 100 V. La fragmentation de l'ADN a été évaluée après coloration au bromure d'éthidium et visualisée sous transillumination UV. (V pour véhicule, ETOH 0.1%)

RÉFÉRENCES

- ADAM, S. A. 2001. "The nuclear pore complex". Genome Biol, vol. 2, p. REVIEWS0007.
- ADAMS, J. M. et S. Cory. 2001. "Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family". Trends in Biochemical Sciences, vol. 26, p. 61-6.
- AHN, J. Y., X. Liu, D. Cheng, J. Peng, P. K. Chan, P. A. Wade et K. Ye. 2005. "Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD". Molecular Cell, vol. 18, p. 435-45.
- AHN, J. Y., X. Liu, Z. Liu, L. Pereira, D. Cheng, J. Peng, P. A. Wade, A. W. Hamburger et K. Ye. 2006. "Nuclear Akt associates with PKC-phosphorylated Ebp1, preventing DNA fragmentation by inhibition of caspase-activated DNase". EMBO Journal, vol. 25, p. 2083-95.
- ALEXANDER, D. R. 2000. "The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function". Seminars in Immunology, vol. 12, p. 349-59.
- ALGECIRAS-SCHIMNICH, A., L. Shen, B. C. Barnhart, A. E. Murmann, J. K. Burkhardt et M. E. Peter. 2002. "Molecular ordering of the initial signaling events of CD95". Molecular and Cellular Biology, vol. 22, p. 207-20.
- ALLAN, L. A. et P. R. Clarke. 2007. "Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis". Molecular Cell, vol. 26, p. 301-10.
- ALLAN, L. A., N. Morrice, S. Brady, G. Magee, S. Pathak et P. R. Clarke. 2003. "Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK". Nat Cell Biol, vol. 5, p. 647-54.
- ALNEMRI, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong et J. Yuan. 1996. "Human ICE/CED-3 protease nomenclature". Cell, vol. 87, p. 171.
- ALTEVOGT, P., J. Schreck, B. Schraven, S. Meuer, V. Schirmacher et A. Mitsch. 1990. "Association of CD2 and T200 (CD45) in mouse T lymphocytes". International Immunology, vol. 2, p. 353-60.
- ALTIN, J. G. et E. K. Sloan. 1997. "The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation". Immunology and Cell Biology, vol. 75, p. 430-45.
- ALVARADO-KRISTENSSON, M., F. Melander, K. Leandersson, L. Ronnstrand, C. Wernstedt et T. Andersson. 2004. "p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils". Journal of Experimental Medicine, vol. 199, p. 449-58.

AMANO, M., M. Galvan, J. He et L. G. Baum. 2003. "The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death". Journal of Biological Chemistry, vol. 278, p. 7469-75.

ANAND, A. R. et R. K. Ganju. 2006. "HIV-1 gp120-mediated apoptosis of T cells is regulated by the membrane tyrosine phosphatase CD45". Journal of Biological Chemistry, vol. 281, p. 12289-99.

ANANTHARAM, V., M. Kitazawa, J. Wagner, S. Kaul et A. G. Kanthasamy. 2002. "Caspase-3-dependent proteolytic cleavage of protein kinase Cdelta is essential for oxidative stress-mediated dopaminergic cell death after exposure to methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl". Journal of Neuroscience, vol. 22, p. 1738-51.

ARDEN, K. C. et W. H. Biggs 3rd. 2002. "Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling". Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 403, p. 292-8.

ARENDT, C. W. et 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". Journal of Biological Chemistry, vol. 272, p. 13117-25.

AROLD, S. T., T. S. Ulmer, T. D. Mulhern, J. M. Werner, J. E. Ladbury, I. D. Campbell et M. E. Noble. 2001. "The role of the Src homology 3-Src homology 2 interface in the regulation of Src kinases". Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 17199-205.

ASHE, P. C. et M. D. Berry. 2003. "Apoptotic signaling cascades". Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, vol. 27, p. 199-214.

ASHKENAZI, A. et V. M. Dixit. 1998. "Death receptors: signaling and modulation". Science, vol. 281, p. 1305-8.

ASHWELL, J. D. et U. D'Oro. 1999. "CD45 and Src-family kinases: and now for something completely different". Immunology Today, vol. 20, p. 412-6.

ASOSINGH, K., A. Willems, I. Van Riet, B. Van Camp et K. Vanderkerken. 2003. "Delayed in vivo disease progression is associated with high proportions of CD45+ myeloma cells in the 5T2MM murine model". Cancer Research, vol. 63, p. 3019-20.

AZAD, A. A. 2000. "Could Nef and Vpr proteins contribute to disease progression by promoting depletion of bystander cells and prolonged survival of HIV-infected cells?". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 267, p. 677-85.

BABA, M., B. Yong Ma, M. Nonaka, Y. Matsuishi, M. Hirano, N. Nakamura, N. Kawasaki, N. Kawasaki et T. Kawasaki. 2007. "Glycosylation-dependent interaction of Jacalin with CD45 induces T lymphocyte activation and Th1/Th2 cytokine secretion". Journal of Leukocyte Biology, vol. 81, p. 1002-11.

- BALDWIN, T. A., M. Gogela-Spehar et 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". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 32071-6.
- BANDA, N. K., J. Bernier, D. K. Kurahara, R. Kurre, N. Haigwood, R. P. Sekaly et T. H. Finkel. 1992. "Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis". Journal of Experimental Medicine, vol. 176, p. 1099-106.
- BAO, Q. et Y. Shi. 2007. "Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases". Cell Death and Differentiation, vol. 14, p. 56-65.
- BARCKETT, M. et T. D. Gilmore. 1999. "Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors". Oncogene, vol. 18, p. 6910-24.
- BARTEK, J. et J. Lukas. 2003. "Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer". Cancer Cell, vol. 3, p. 421-9.
- BAUM, L. G., M. Pang, N. L. Perillo, T. Wu, A. Delegeane, C. H. Uittenbogaart, M. Fukuda et J. J. Seilhamer. 1995. "Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells". Journal of Experimental Medicine, vol. 181, p. 877-87.
- BAUR, A., S. Garber et B. M. Peterlin. 1994. "Effects of CD45 on NF-kappa B. Implications for replication of HIV-1". Journal of Immunology, vol. 152, p. 976-83.
- BEAUSOLEIL, S. A., M. Jedrychowski, D. Schwartz, J. E. Elias, J. Villen, J. Li, M. A. Cohn, L. C. Cantley et S. P. Gygi. 2004. "Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 101, p. 12130-5.
- BERGMANN, A., J. Agapite et H. Steller. 1998. "Mechanisms and control of programmed cell death in invertebrates". Oncogene, vol. 17, p. 3215-23.
- BESNAULT-MASCARD, L., C. Leprince, M. T. Auffredou, B. Meunier, M. F. Bourgeade, J. Camonis, H. K. Lorenzo et A. Vazquez. 2005. "Caspase-8 sumoylation is associated with nuclear localization". Oncogene, vol. 24, p. 3268-73.
- BHARTI, A., S. K. Kraeft, M. Gounder, P. Pandey, S. Jin, Z. M. Yuan, S. P. Lees-Miller, R. Weichselbaum, D. Weaver, L. B. Chen, D. Kufe et S. Kharbanda. 1998. "Inactivation of DNA-dependent protein kinase by protein kinase Cdelta: implications for apoptosis". Molecular and Cellular Biology, vol. 18, p. 6719-28.
- BI, S., L. A. Earl, L. Jacobs et L. G. Baum. 2008. "Structural features of galectin-9 and galectin-1 that determine distinct T cell death pathways". Journal of Biological Chemistry, vol. 283, p. 12248-58.

- BILLADEAU, D. D. et P. J. Leibson. 2002. "ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation". Journal of Clinical Investigation, vol. 109, p. 161-8.
- BILWES, A. M., J. den Hertog, T. Hunter et J. P. Noel. 1996. "Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization". Nature, vol. 382, p. 555-9.
- BIRKELAND, M. L., P. Johnson, I. S. Trowbridge et E. Pure. 1989. "Changes in CD45 isoform expression accompany antigen-induced murine T-cell activation". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 86, p. 6734-8.
- BLANK, N., M. Kriegel, T. Hieronymus, T. Geiler, S. Winkler, J. R. Kalden et H. M. Lorenz. 2001. "CD45 tyrosine phosphatase controls common gamma-chain cytokine-mediated STAT and extracellular signal-related kinase phosphorylation in activated human lymphoblasts: inhibition of proliferation without induction of apoptosis". Journal of Immunology, vol. 166, p. 6034-40.
- BLAYLOCK, M. G., D. W. Sexton et G. M. Walsh. 1999. "Ligation of CD45 and the isoforms CD45RA and CD45RB accelerates the rate of constitutive apoptosis in human eosinophils". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 104, p. 1244-50.
- BLEESING, J. J., M. R. Morrow, G. Uzel et 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". Cellular Immunology, vol. 213, p. 72-81.
- BORNER, C. 2003. "The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions". Molecular Immunology, vol. 39, p. 615-47.
- BOULARES, A. H., A. J. Zoltoski, F. J. Contreras, A. G. Yakovlev, K. Yoshihara et M. E. Smulson. 2002. "Regulation of DNAS1L3 endonuclease activity by poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage in endonuclease activation". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 372-8.
- BRADY, S. C., L. A. Allan et P. R. Clarke. 2005. "Regulation of caspase 9 through phosphorylation by protein kinase C zeta in response to hyperosmotic stress". Molecular and Cellular Biology, vol. 25, p. 10543-55.
- BRAZIL, D. P., Z. Z. Yang et B. A. Hemmings. 2004. "Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts". Trends in Biochemical Sciences, vol. 29, p. 233-42.
- BRODIE, C. et P. M. Blumberg. 2003. "Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta". Apoptosis, vol. 8, p. 19-27.

- BUENDIA, B., A. Santa-Maria et J. C. Courvalin. 1999. "Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis". Journal of Cell Science, vol. 112 (Pt 11), p. 1743-53.
- BURNS, C. M., K. Sakaguchi, E. Appella et J. D. Ashwell. 1994. "CD45 regulation of tyrosine phosphorylation and enzyme activity of src family kinases". Journal of Biological Chemistry, vol. 269, p. 13594-600.
- BURSTEIN, E. et C. S. Duckett. 2003. "Dying for NF-kappaB? Control of cell death by transcriptional regulation of the apoptotic machinery". Current Opinion in Cell Biology, vol. 15, p. 732-7.
- BYTH, K. F., L. A. Conroy, S. Howlett, A. J. Smith, J. May, D. R. Alexander et 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". Journal of Experimental Medicine, vol. 183, p. 1707-18.
- CAIN, K., S. B. Bratton et G. M. Cohen. 2002. "The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex". Biochimie, vol. 84, p. 203-14.
- CALE, C. M., N. J. Klein, V. Novelli, P. Veys, A. M. Jones et G. Morgan. 1997. "Severe combined immunodeficiency with abnormalities in expression of the common leucocyte antigen, CD45". Archives of Disease in Childhood, vol. 76, p. 163-4.
- CARDONE, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch et J. C. Reed. 1998. "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation". Science, vol. 282, p. 1318-21.
- CASPARI, T. 2000. "How to activate p53". Current Biology, vol. 10, p. R315-7.
- CHAN, T. O. et P. N. Tsichlis. 2001. "PK2: a complex tail in one Akt". Sci STKE, vol. 2001, p. PE1.
- CHANG, D. W., Z. Xing, Y. Pan, A. Algeciras-Schimmich, B. C. Barnhart, S. Yaish-Ohad, M. E. Peter et X. Yang. 2002. "c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis". EMBO Journal, vol. 21, p. 3704-14.
- CHANG, H. Y. et X. Yang. 2000. "Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases". Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 64, p. 821-46.
- CHANG, L. et M. Karin. 2001. "Mammalian MAP kinase signalling cascades". Nature, vol. 410, p. 37-40.
- CHEN, D., R. A. Stetler, G. Cao, W. Pei, C. O'Horo, X. M. Yin et 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". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 38508-17.

- CHEN, X., X. Lan, S. Mo, J. Qin, W. Li, P. Liu, Y. Han et R. Pi. 2009. "p38 and ERK, but not JNK, are involved in copper-induced apoptosis in cultured cerebellar granule neurons". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 379, p. 944-8.
- CHEN, Z., M. Naito, S. Hori, T. Mashima, T. Yamori et T. Tsuruo. 1999. "A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 264, p. 847-54.
- CHENG, E. H., J. Nicholas, D. S. Bellows, G. S. Hayward, H. G. Guo, M. S. Reitz et J. M. Hardwick. 1997. "A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 94, p. 690-4.
- CHIARUGI, P. 2008. "Src redox regulation: there is more than meets the eye". Molecules and Cells, vol. 26, p. 329-37.
- CHIPUK, J. E. et D. R. Green. 2006. "Dissecting p53-dependent apoptosis". Cell Death and Differentiation, vol. 13, p. 994-1002.
- CHO, S. G., J. W. Kim, Y. H. Lee, H. S. Hwang, M. S. Kim, K. Ryoo, M. J. Kim, K. T. Noh, E. K. Kim, J. H. Cho, K. W. Yoon, E. G. Cho, H. S. Park, S. W. Chi, M. J. Lee, S. S. Kang, H. Ichijo et E. J. Choi. 2003. "Identification of a novel antiapoptotic protein that antagonizes ASK1 and CAD activities". Journal of Cell Biology, vol. 163, p. 71-81.
- CHOWDHURY, I., B. Tharakan et G. K. Bhat. 2008. "Caspases - an update". Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology, vol. 151, p. 10-27.
- CHUMAKOV, P. M. 2007. "Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms". Biochemistry, vol. 72, p. 1399-421.
- CHUNG, Y. L., M. L. Sheu et S. H. Yen. 2003. "Hepatitis C virus NS5A as a potential viral Bcl-2 homologue interacts with Bax and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma". International Journal of Cancer, vol. 107, p. 65-73.
- COHEN, J. J. 1993. "Apoptosis: the physiologic pathway of cell death". Hospital Practice (Office Edition), vol. 28, p. 35-43.
- COUNIS, M. F. et A. Torriglia. 2000. "DNases and apoptosis". Biochemistry and Cell Biology, vol. 78, p. 405-14.
- CRONSHAW, J. M., A. N. Krutchinsky, W. Zhang, B. T. Chait et M. J. Matunis. 2002. "Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex". Journal of Cell Biology, vol. 158, p. 915-27.
- CROSS, T., G. Griffiths, E. Deacon, R. Sallis, M. Gough, D. Watters et J. M. Lord. 2000. "PKC-delta is an apoptotic lamin kinase". Oncogene, vol. 19, p. 2331-7.

- D'ORO, U. et J. D. Ashwell. 1999. "Cutting edge: the CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes". Journal of Immunology, vol. 162, p. 1879-83.
- DANIAL, N. N. 2007. "BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death". Clinical Cancer Research, vol. 13, p. 7254-63.
- DANIAL, N. N. et S. J. Korsmeyer. 2004. "Cell death: critical control points". Cell, vol. 116, p. 205-19.
- DE LA TAILLE, A., M. W. Chen, M. Burchardt, D. K. Chopin et R. Buttyan. 1999. "Apoptotic conversion: evidence for exchange of genetic information between prostate cancer cells mediated by apoptosis". Cancer Research, vol. 59, p. 5461-3.
- DEGTEREV, A., M. Boyce et J. Yuan. 2003. "A decade of caspases". Oncogene, vol. 22, p. 8543-67.
- DEL PESO, L., V. M. Gonzalez, N. Inohara, R. E. Ellis et 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*". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 27205-11.
- DELCOMMENNE, M., C. Tan, V. Gray, L. Rue, J. Woodgett et S. Dedhar. 1998. "Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, p. 11211-6.
- DENAULT, J. B. et G. S. Salvesen. 2002. "Caspases: keys in the ignition of cell death". Chemical Reviews, vol. 102, p. 4489-500.
- DEPRAETERE, V. et P. Golstein. 1997. "Fas and other cell death signaling pathways". Seminars in Immunology, vol. 9, p. 93-107.
- DESAI, D. M., J. Sap, J. Schlessinger et A. Weiss. 1993. "Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase". Cell, vol. 73, p. 541-54.
- DESHARNAIS, P., G. Dupere-Minier, C. Hamelin, P. Devine et J. Bernier. 2008. "Involvement of CD45 in DNA fragmentation in apoptosis induced by mitochondrial perturbing agents". Apoptosis, vol. 13, p. 197-212.
- DHANASEKARAN, D. N. et E. P. Reddy. 2008. "JNK signaling in apoptosis". Oncogene, vol. 27, p. 6245-51.
- DORNAN, S., Z. Sebestyen, J. Gamble, P. Nagy, A. Bodnar, L. Alldridge, S. Doe, N. Holmes, L. K. Goff, P. Beverley, J. Szollosi et D. R. Alexander. 2002. "Differential association of CD45 isoforms with CD4 and CD8 regulates the actions of specific pools of p56lck tyrosine kinase in T cell antigen receptor signal transduction". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 1912-8.

- DUPERE-MINIER, G., C. Hamelin, P. Desharnais et J. Bernier. 2004. "Apoptotic volume decrease, pH acidification and chloride channel activation during apoptosis requires CD45 expression in HPB-ALL T cells". Apoptosis, vol. 9, p. 543-51.
- DURONIO, V. 2008. "The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway". Biochemical Journal, vol. 415, p. 333-44.
- EARL, L. A. et L. G. Baum. 2008. "CD45 glycosylation controls T-cell life and death". Immunology and Cell Biology, vol. 86, p. 608-15.
- EARNSHAW, W. C., L. M. Martins et S. H. Kaufmann. 1999. "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis". Annual Review of Biochemistry, vol. 68, p. 383-424.
- EBERLE, A., R. Reinehr, S. Becker, V. Keitel et D. Haussinger. 2007. "CD95 tyrosine phosphorylation is required for CD95 oligomerization". Apoptosis, vol. 12, p. 719-29.
- ECKELMAN, B. P., G. S. Salvesen et F. L. Scott. 2006. "Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family". EMBO Rep, vol. 7, p. 988-94.
- ECKHART, L., A. Uthman, W. Sipos et E. Tschachler. 2006. "Genome sequence comparison reveals independent inactivation of the caspase-15 gene in different evolutionary lineages of mammals". Molecular Biology and Evolution, vol. 23, p. 2081-9.
- EDWARDS, J. C. et S. Kapadia. 2000. "Regulation of the bovine kidney microsomal chloride channel p64 by p59fyn, a Src family tyrosine kinase". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 31826-32.
- EISCHEN, C. M., C. J. Dick et P. J. Leibson. 1994. "Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis". Journal of Immunology, vol. 153, p. 1947-54.
- ELLIOTT, J. I., A. Sardini, J. C. Cooper, D. R. Alexander, S. Davanture, G. Chimini et C. F. Higgins. 2006. "Phosphatidylserine exposure in B lymphocytes: a role for lipid packing". Blood, vol. 108, p. 1611-7.
- ELLIOTT, J. I., A. Surprenant, F. M. Marelli-Berg, J. C. Cooper, R. L. Cassady-Cain, C. Wooding, K. Linton, D. R. Alexander et C. F. Higgins. 2005. "Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes". Nat Cell Biol, vol. 7, p. 808-16.
- ELLIS, R. E., J. Y. Yuan et H. R. Horvitz. 1991. "Mechanisms and functions of cell death". Annual Review of Cell Biology, vol. 7, p. 663-98.
- EMANUELE, S., M. Lauricella et G. Tesoriere. 2008. "Histone deacetylase inhibitors: apoptotic effects and clinical implications (Review)". International Journal of Oncology, vol. 33, p. 637-46.

- ENARI, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu et S. Nagata. 1998. "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD". Nature, vol. 391, p. 43-50.
- FADEEL, B., S. Orrenius et B. Zhivotovsky. 1999. "Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony?". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 266, p. 699-717.
- FADOK, V. A. et G. Chimini. 2001. "The phagocytosis of apoptotic cells". Seminars in Immunology, vol. 13, p. 365-72.
- FAHRENKROG, B. 2006. "The nuclear pore complex, nuclear transport, and apoptosis". Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, vol. 84, p. 279-86.
- FAITOVA, J., D. Krekac, R. Hrstka et B. Vojtesek. 2006. "Endoplasmic reticulum stress and apoptosis". Cell Mol Biol Lett, vol. 11, p. 488-505.
- FAJKA-BOJA, R., M. Szemes, G. Ion, A. Legradi, M. Caron et E. Monostori. 2002. "Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines". Immunology Letters, vol. 82, p. 149-54.
- FALEIRO, L. et Y. Lazebnik. 2000. "Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier". Journal of Cell Biology, vol. 151, p. 951-9.
- FENG, J., J. Park, P. Cron, D. Hess et B. A. Hemmings. 2004. "Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase". Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p. 41189-96.
- FERRANDO-MAY, E. 2005. "Nucleocytoplasmic transport in apoptosis". Cell Death and Differentiation, vol. 12, p. 1263-76.
- FERRANDO-MAY, E., V. Cordes, I. Biller-Ckovric, J. Mirkovic, D. Gorlich et P. Nicotera. 2001. "Caspases mediate nucleoporin cleavage, but not early redistribution of nuclear transport factors and modulation of nuclear permeability in apoptosis". Cell Death and Differentiation, vol. 8, p. 495-505.
- FESIK, S. W. 2000. "Insights into programmed cell death through structural biology". Cell, vol. 103, p. 273-82.
- FESTJENS, N., T. Vanden Berghe et P. Vandenabeele. 2006. "Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1757, p. 1371-87.
- FIALKOW, L., C. K. Chan et G. P. Downey. 1997. "Inhibition of CD45 during neutrophil activation". Journal of Immunology, vol. 158, p. 5409-17.

- FINK, S. L. et B. T. Cookson. 2005. "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells". Infection and Immunity, vol. 73, p. 1907-16.
- FLEURY, C., B. Mignotte et J. L. Vayssiere. 2002. "Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling". Biochimie, vol. 84, p. 131-41.
- FORTIN, M., A. M. Steff, J. Felberg, I. Ding, B. Schraven, P. Johnson et P. Hugo. 2002. "Apoptosis mediated through CD45 is independent of its phosphatase activity and association with leukocyte phosphatase-associated phosphoprotein". Journal of Immunology, vol. 168, p. 6084-9.
- FOUILLIT, M., R. Joubert-Caron, F. Poirier, P. Bourin, E. Monostori, M. Levi-Strauss, M. Raphael, D. Bladier et M. Caron. 2000. "Regulation of CD45-induced signaling by galectin-1 in Burkitt lymphoma B cells". Glycobiology, vol. 10, p. 413-9.
- FRANKE, T. F. 2000. "Assays for Akt". Methods in Enzymology, vol. 322, p. 400-10.
- FRANKE, T. F., C. P. Hornik, L. Segev, G. A. Shostak et C. Sugimoto. 2003. "PI3K/Akt and apoptosis: size matters". Oncogene, vol. 22, p. 8983-98.
- FREARSON, J. A. et D. R. Alexander. 1996. "Protein tyrosine phosphatases in T-cell development, apoptosis and signalling". Immunology Today, vol. 17, p. 385-91.
- FRESNO VARA, J. A., E. Casado, J. de Castro, P. Cejas, C. Belda-Iniesta et M. Gonzalez-Baron. 2004. "PI3K/Akt signalling pathway and cancer". Cancer Treatment Reviews, vol. 30, p. 193-204.
- FRIED, H. et U. Kutay. 2003. "Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory". Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 60, p. 1659-88.
- FUENTES-PRIOR, P. et G. S. Salvesen. 2004. "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition". Biochemical Journal, vol. 384, p. 201-32.
- GEISLER, C. 2004. "TCR trafficking in resting and stimulated T cells". Critical Reviews in Immunology, vol. 24, p. 67-86.
- GENNARI, A., M. Potters, W. Seinen et R. Pieters. 1997. "Organotin-induced apoptosis as observed in vitro is not relevant for induction of thymus atrophy at antiproliferative doses". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 147, p. 259-66.
- GIOVANNETTI, A., M. Pierdominici, F. Mazzetta, A. M. Mazzone, G. Ricci, A. Prozzo, F. Pandolfi, R. Paganelli et F. Aiuti. 2000. "HIV type 1-induced inhibition of CD45 tyrosine phosphatase activity correlates with disease progression and apoptosis, but not with anti-CD3-induced T cell proliferation". AIDS Research and Human Retroviruses, vol. 16, p. 211-9.

- GLOIRE, G., E. Charlier et J. Piette. 2008. "Regulation of CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis by protein phosphatases". Biochemical Pharmacology, vol. 76, p. 1451-8.
- GOTTLIEB, R. A. 1999. "Mitochondria: ignition chamber for apoptosis". Molecular Genetics and Metabolism, vol. 68, p. 227-31.
- GREEN, D. R. et G. Kroemer. 2004. "The pathophysiology of mitochondrial cell death". Science, vol. 305, p. 626-9.
- GREEN, D. R. et J. C. Reed. 1998. "Mitochondria and apoptosis". Science, vol. 281, p. 1309-12.
- GREER, S. F., Y. Wang, C. Raman et L. B. Justement. 2001. "CD45 function is regulated by an acidic 19-amino acid insert in domain II that serves as a binding and phosphoacceptor site for casein kinase 2". Journal of Immunology, vol. 166, p. 7208-18.
- GROSS, A., J. M. McDonnell et S. J. Korsmeyer. 1999. "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis". Genes and Development, vol. 13, p. 1899-911.
- GU, J., R. P. Dong, C. Zhang, D. F. McLaughlin, M. X. Wu et S. F. Schlossman. 1999. "Functional interaction of DFF35 and DFF45 with caspase-activated DNA fragmentation nuclease DFF40". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 20759-62.
- GUNTERMANN, C., N. Amft, B. J. Murphy et K. E. Nye. 1998. "Impaired CD45-associated tyrosine phosphatase activity during HIV-1 infection: implications for CD3 and CD4 receptor signalling". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 252, p. 69-77.
- HALENBECK, R., H. MacDonald, A. Roulston, T. T. Chen, L. Conroy et L. T. Williams. 1998. "CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45". Current Biology, vol. 8, p. 537-40.
- HANUS, J., M. Kalinowska-Herok et P. Widlak. 2008. "The major apoptotic endonuclease DFF40/CAD is a deoxyribose-specific and double-strand-specific enzyme". Apoptosis, vol. 13, p. 377-82.
- HARADA, T., F. Taniguchi, M. Izawa, Y. Ohama, Y. Takenaka, Y. Tagashira, A. Ikeda, A. Watanabe, T. Iwabe et N. Terakawa. 2007. "Apoptosis and endometriosis". Frontiers in Bioscience, vol. 12, p. 3140-51.
- HARREMAN, M. T., T. M. Kline, H. G. Milford, M. B. Harben, A. E. Hodel et A. H. Corbett. 2004. "Regulation of nuclear import by phosphorylation adjacent to nuclear localization signals". Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p. 20613-21.
- HASHIMOTO, E. et H. Yamamura. 1989. "Further studies on the ionic strength-dependent proteolytic activation of protein kinase C in rat liver plasma membrane by endogenous trypsin-like protease". J Biochem, vol. 106, p. 1041-8.

- HE, J. et L. G. Baum. 2004. "Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death". Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p. 4705-12.
- HEATH-ENGEL, H. M., N. C. Chang et G. C. Shore. 2008. "The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family". Oncogene, vol. 27, p. 6419-33.
- HEHNER, S. P., T. G. Hofmann, F. Ratter, W. Droge et M. L. Schmitz. 1999. "Inhibition of tyrosine phosphatases antagonizes CD95-mediated apoptosis". European Journal of Biochemistry, vol. 264, p. 132-9.
- HENGARTNER, M. O. 2000. "The biochemistry of apoptosis". Nature, vol. 407, p. 770-6.
- HENGARTNER, M. O. et H. R. Horvitz. 1994. "C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2". Cell, vol. 76, p. 665-76.
- HERMISTON, M. L., Z. Xu et A. Weiss. 2003. "CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells". Annual Review of Immunology, vol. 21, p. 107-37.
- HERMISTON, M. L., J. Zikherman et J. W. Zhu. 2009. "CD45, CD148, and Lyp/Pep: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells". Immunological Reviews, vol. 228, p. 288-311.
- HILL, M. M., C. Adrain et S. J. Martin. 2003. "Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows". Mol Interv, vol. 3, p. 19-26.
- HINSHAW, J. E., B. O. Carragher et R. A. Milligan. 1992. "Architecture and design of the nuclear pore complex". Cell, vol. 69, p. 1133-41.
- HITOMI, J., T. Katayama, Y. Eguchi, T. Kudo, M. Taniguchi, Y. Koyama, T. Manabe, S. Yamagishi, Y. Bando, K. Imaizumi, Y. Tsujimoto et M. Tohyama. 2004. "Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death". Journal of Cell Biology, vol. 165, p. 347-56.
- HITOSHI, Y., J. Lorens, S. I. Kitada, J. Fisher, M. LaBarge, H. Z. Ring, U. Francke, J. C. Reed, S. Kinoshita et G. P. Nolan. 1998. "Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells". Immunity, vol. 8, p. 461-71.
- HOCKENBERY, D., G. Nunez, C. Milliman, R. D. Schreiber et S. J. Korsmeyer. 1990. "Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death". Nature, vol. 348, p. 334-6.
- HOLLER, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed et J. Tschopp. 2000. "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule". Nat Immunol, vol. 1, p. 489-95.

- HOLLSTEIN, M., D. Sidransky, B. Vogelstein et C. C. Harris. 1991. "p53 mutations in human cancers". Science, vol. 253, p. 49-53.
- HOLMES, N. 2006. "CD45: all is not yet crystal clear". Immunology, vol. 117, p. 145-55.
- HORN, H. F. et K. H. Vousden. 2007. "Coping with stress: multiple ways to activate p53". Oncogene, vol. 26, p. 1306-16.
- HORVITZ, H. R. 1999. "Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*". Cancer Research, vol. 59, p. 1701s-1706s.
- HOUSLAY, M. D. 1991. "'Crosstalk': a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways". European Journal of Biochemistry, vol. 195, p. 9-27.
- HSU, H., J. Huang, H. B. Shu, V. Baichwal et D. V. Goeddel. 1996. "TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex". Immunity, vol. 4, p. 387-96.
- HSU, H., J. Xiong et D. V. Goeddel. 1995. "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation". Cell, vol. 81, p. 495-504.
- HU, Y., M. A. Benedict, L. Ding et G. Nunez. 1999. "Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis". EMBO Journal, vol. 18, p. 3586-95.
- HU, Y., L. Ding, D. M. Spencer et G. Nunez. 1998. "WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 33489-94.
- HUANG, D. C., J. M. Adams et 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 Journal, vol. 17, p. 1029-39.
- HUSSAIN, S., J. W. Assender, M. Bond, L. F. Wong, D. Murphy et A. C. Newby. 2002. "Activation of protein kinase Czeta is essential for cytokine-induced metalloproteinase-1, -3, and -9 secretion from rabbit smooth muscle cells and inhibits proliferation". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 27345-52.
- IGUCHI, K., K. Hirano et R. Ishida. 2002. "Activation of caspase-3, proteolytic cleavage of DFF and no oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic Molt-4 cells". J Biochem, vol. 131, p. 469-75.
- IIDA, N., V. B. Lokeshwar et L. Y. Bourguignon. 1994. "Mapping the fodrin binding domain in CD45, a leukocyte membrane-associated tyrosine phosphatase". Journal of Biological Chemistry, vol. 269, p. 28576-83.

- IMAI, Y., T. Kimura, A. Murakami, N. Yajima, K. Sakamaki et S. Yonehara. 1999. "The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis". Nature, vol. 398, p. 777-85.
- INOHARA, N., T. Koseki, S. Chen, M. A. Benedict et G. Nunez. 1999. "Identification of regulatory and catalytic domains in the apoptosis nuclease DFF40/CAD". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 270-4.
- IRIE-SASAKI, J., T. Sasaki, W. Matsumoto, A. Opavsky, M. Cheng, G. Welstead, E. Griffiths, C. Krawczyk, C. D. Richardson, K. Aitken, N. Iscove, G. Koretzky, P. Johnson, P. Liu, D. M. Rothstein et J. M. Penninger. 2001. "CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling". Nature, vol. 409, p. 349-54.
- IRLES, C., A. Symons, F. Michel, T. R. Bakker, P. A. van der Merwe et O. Acuto. 2003. "CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling". Nat Immunol, vol. 4, 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 et J. Tschopp. 1997. "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP". Nature, vol. 388, p. 190-5.
- ISAKOV, N. 1993. "Tyrosine phosphorylation and dephosphorylation in T lymphocyte activation". Molecular Immunology, vol. 30, p. 197-210.
- ISHIKAWA, H., M. S. Mahmoud, R. Fujii, S. Abroun et M. M. Kawano. 2000. "Proliferation of immature myeloma cells by interleukin-6 is associated with CD45 expression in human multiple myeloma". Leukemia and Lymphoma, vol. 39, p. 51-5.
- ITOH, N. et S. Nagata. 1993. "A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen". Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 10932-7.
- IVANOV, V. N. et Z. Ronai. 2000. "p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF-kappaB activity and Fas expression". Oncogene, vol. 19, p. 3003-12.
- JAHANI-ASL, A., A. Basak et B. K. Tsang. 2007. "Caspase-3-mediated cleavage of Akt: involvement of non-consensus sites and influence of phosphorylation". FEBS Letters, vol. 581, p. 2883-8.
- JANICKE, R. U., M. L. Sprengart, M. R. Wati et A. G. Porter. 1998. "Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 9357-60.
- JEONG, S. Y. et D. W. Seol. 2008. "The role of mitochondria in apoptosis". BMB Rep, vol. 41, p. 11-22.

- JIA, S. H., J. Parodo, A. Kapus, O. D. Rotstein et J. C. Marshall. 2008. "Dynamic regulation of neutrophil survival through tyrosine phosphorylation or dephosphorylation of caspase-8". Journal of Biological Chemistry, vol. 283, p. 5402-13.
- JIA, Y. T., W. Wei, B. Ma, Y. Xu, W. J. Liu, Y. Wang, K. Y. Lv, H. T. Tang, D. Wei et Z. F. Xia. 2007. "Activation of p38 MAPK by reactive oxygen species is essential in a rat model of stress-induced gastric mucosal injury". Journal of Immunology, vol. 179, p. 7808-19.
- JURKIEWICZ, M., D. A. Averill-Bates, M. Marion et F. DenizEAU. 2004. "Involvement of mitochondrial and death receptor pathways in tributyltin-induced apoptosis in rat hepatocytes". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1693, p. 15-27.
- JUSTEMENT, L. B., K. S. Campbell, N. C. Chien et J. C. Cambier. 1991. "Regulation of B cell antigen receptor signal transduction and phosphorylation by CD45". Science, vol. 252, p. 1839-42.
- KAM, P. C. et N. I. Ferch. 2000. "Apoptosis: mechanisms and clinical implications". Anaesthesia, vol. 55, p. 1081-93.
- KARIN, M. et A. Lin. 2002. "NF-kappaB at the crossroads of life and death". Nat Immunol, vol. 3, p. 221-7.
- KASHIO, N., W. Matsumoto, S. Parker et D. M. Rothstein. 1998. "The second domain of the CD45 protein tyrosine phosphatase is critical for interleukin-2 secretion and substrate recruitment of TCR-zeta in vivo". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 33856-63.
- KAUFMAN, R. J. 1999. "Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls". Genes and Development, vol. 13, p. 1211-33.
- KAWAGUCHI, Y., A. Ito, E. Appella et T. P. Yao. 2006. "Charge modification at multiple C-terminal lysine residues regulates p53 oligomerization and its nucleus-cytoplasm trafficking". Journal of Biological Chemistry, vol. 281, p. 1394-400.
- KAWANE, K., H. Fukuyama, H. Yoshida, H. Nagase, Y. Ohsawa, Y. Uchiyama, K. Okada, T. Iida et S. Nagata. 2003. "Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation". Nat Immunol, vol. 4, p. 138-44.
- KELEKAR, A., B. S. Chang, J. E. Harlan, S. W. Fesik et C. B. Thompson. 1997. "Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL". Molecular and Cellular Biology, vol. 17, p. 7040-6.

- KEPPLER, O. T., M. E. Peter, S. Hinderlich, G. Moldenhauer, P. Stehling, I. Schmitz, R. Schwartz-Albiez, W. Reutter et M. Pawlita. 1999. "Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus". Glycobiology, vol. 9, p. 557-69.
- KERR, J. F., A. H. Wyllie et A. R. Currie. 1972. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics". British Journal of Cancer, vol. 26, p. 239-57.
- KHWAJA, A. et L. Tatton. 1999. "Caspase-mediated proteolysis and activation of protein kinase Cdelta plays a central role in neutrophil apoptosis". Blood, vol. 94, p. 291-301.
- KIEFER, F., W. F. Vogel et R. Arnold. 2002. "Signal transduction and co-stimulatory pathways". Transplant Immunology, vol. 9, p. 69-82.
- KIHLMARK, M., G. Imreh et E. Hallberg. 2001. "Sequential degradation of proteins from the nuclear envelope during apoptosis". Journal of Cell Science, vol. 114, p. 3643-53.
- KIHLMARK, M., C. Rustum, C. Eriksson, M. Beckman, K. Iverfeldt et E. Hallberg. 2004. "Correlation between nucleocytoplasmic transport and caspase-3-dependent dismantling of nuclear pores during apoptosis". Experimental Cell Research, vol. 293, p. 346-56.
- KIM, H. E., F. Du, M. Fang et X. Wang. 2005. "Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 102, p. 17545-50.
- KIRCHBERGER, S., O. Majdic, S. Bluml, C. Schrauf, J. Leitner, C. Gerner, W. Paster, N. Gundacker, M. Sibilica et J. Stockl. 2008. "The cytoplasmic tail of CD45 is released from activated phagocytes and can act as an inhibitory messenger for T cells". Blood, vol. 112, p. 1240-8.
- KLAUS, S. J., S. P. Sidorenko et E. A. Clark. 1996. "CD45 ligation induces programmed cell death in T and B lymphocytes". Journal of Immunology, vol. 156, p. 2743-53.
- KOENIG, U., L. Eckhart et E. Tschachler. 2001. "Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 285, p. 1150-4.
- KOPETZ, S., A. N. Shah et G. E. Gallick. 2007. "Src continues aging: current and future clinical directions". Clinical Cancer Research, vol. 13, p. 7232-6.

KORETZKY, G. A. et P. S. Myung. 2001. "Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins". Nat Rev Immunol, vol. 1, p. 95-107.

KORETZKY, G. A., J. Picus, T. Schultz et A. Weiss. 1991. "Tyrosine phosphatase CD45 is required for T-cell antigen receptor and CD2-mediated activation of a protein tyrosine kinase and interleukin 2 production". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 88, p. 2037-41.

KOVARIK, P., D. Stoiber, P. A. Evers, R. Menghini, A. Neininger, M. Gaestel, P. Cohen et T. Decker. 1999. "Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated protein kinase whereas IFN-gamma uses a different signaling pathway". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, p. 13956-61.

KRAMER, R. M. et J. D. Sharp. 1997. "Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2)". FEBS Letters, vol. 410, p. 49-53.

KRIESER, R. J. et K. White. 2002. "Engulfment mechanism of apoptotic cells". Current Opinion in Cell Biology, vol. 14, p. 734-8.

KROEMER, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky et G. Melino. 2009. "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009". Cell Death and Differentiation, vol. 16, p. 3-11.

KUCHARCZAK, J., M. J. Simmons, Y. Fan et C. Gelinas. 2003. "To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis". Oncogene, vol. 22, p. 8961-82.

KUMAR, S. 2007. "Caspase function in programmed cell death". Cell Death and Differentiation, vol. 14, p. 32-43.

KUMAR, S., S. V. Rajkumar, T. Kimlinger, P. R. Greipp et T. E. Witzig. 2005. "CD45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: clinical and biological correlations". Leukemia, vol. 19, p. 1466-70.

KUTUK, O., A. Pedrech, P. Harrison et H. Basaga. 2005. "Pramanicin induces apoptosis in Jurkat leukemia cells: a role for JNK, p38 and caspase activation". Apoptosis, vol. 10, p. 597-609.

LATINIS, K. M. et G. A. Koretzky. 1996. "Fas ligation induces apoptosis and Jun kinase activation independently of CD45 and Lck in human T cells". Blood, vol. 87, p. 871-5.

- LAUBER, K., H. A. Appel, S. F. Schlosser, M. Gregor, K. Schulze-Osthoff et S. Wesselborg. 2001. "The adapter protein apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) is proteolytically processed during apoptosis". Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 29772-81.
- LECHARDEUR, D., S. Dougaparsad, C. Nemes et G. L. Lukacs. 2005. "Oligomerization state of the DNA fragmentation factor in normal and apoptotic cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 280, p. 40216-25.
- LECHARDEUR, D., L. Drzymala, M. Sharma, D. Zylka, R. Kinach, J. Pacia, C. Hicks, N. Usmani, J. M. Rommens et G. L. Lukacs. 2000. "Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD)". Journal of Cell Biology, vol. 150, p. 321-34.
- LECHARDEUR, D., M. Xu et G. L. Lukacs. 2004. "Contrasting nuclear dynamics of the caspase-activated DNase (CAD) in dividing and apoptotic cells". Journal of Cell Biology, vol. 167, p. 851-62.
- LECOEUR, H. 2002. "Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases". Experimental Cell Research, vol. 277, p. 1-14.
- LEE, I., A. R. Salomon, K. Yu, J. W. Doan, L. I. Grossman et M. Huttemann. 2006. "New prospects for an old enzyme: mammalian cytochrome c is tyrosine-phosphorylated in vivo". Biochemistry, vol. 45, p. 9121-8.
- LEFEBVRE, D. C., J. Felberg, J. L. Cross et P. Johnson. 2003. "The noncatalytic domains of Lck regulate its dephosphorylation by CD45". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1650, p. 40-9.
- LEPPLE-WIENHUES, A., I. Szabo, T. Laun, N. K. Kaba, E. Gulbins et F. Lang. 1998. "The tyrosine kinase p56lck mediates activation of swelling-induced chloride channels in lymphocytes". Journal of Cell Biology, vol. 141, p. 281-6.
- LESAGE, S., A. M. Steff, F. Philippoussis, M. Page, S. Trop, V. Mateo et P. Hugo. 1997. "CD4+ CD8+ thymocytes are preferentially induced to die following CD45 cross-linking, through a novel apoptotic pathway". Journal of Immunology, vol. 159, p. 4762-71.
- LIANG, S. H. et M. F. Clarke. 2001. "Regulation of p53 localization". European Journal of Biochemistry, vol. 268, p. 2779-83.
- LIN, H. H., H. L. Hsu et N. H. Yeh. 2007. "Apoptotic cleavage of NuMA at the C-terminal end is related to nuclear disruption and death amplification". Journal of Biomedical Science, vol. 14, p. 681-94.

- 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 et C. B. Thompson. 2000. "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues". Molecular Cell, vol. 6, p. 1389-99.
- LIU, Q. L., H. Kishi, K. Ohtsuka et A. Muraguchi. 2003. "Heat shock protein 70 binds caspase-activated DNase and enhances its activity in TCR-stimulated T cells". Blood, vol. 102, p. 1788-96.
- LIU, S., H. Ishikawa, N. Tsuyama, F. J. Li, S. Abroun, K. I. Otsuyama, X. Zheng, Z. Ma, Y. Maki, M. S. Iqbal, M. Obata et M. M. Kawano. 2006. "Increased susceptibility to apoptosis in CD45(+) myeloma cells accompanied by the increased expression of VDAC1". Oncogene, vol. 25, p. 419-29.
- LIU, X., P. Li, P. Widlak, H. Zou, X. Luo, W. T. Garrard et X. Wang. 1998. "The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, p. 8461-6.
- LIU, X., H. Zou, C. Slaughter et X. Wang. 1997. "DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis". Cell, vol. 89, p. 175-84.
- LIU, X., H. Zou, P. Widlak, W. Garrard et X. Wang. 1999. "Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 13836-40.
- LOEFFLER, M. et G. Kroemer. 2000. "The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita". Experimental Cell Research, vol. 256, p. 19-26.
- LOKESHWAR, V. B. et L. Y. Bourguignon. 1992. "Tyrosine phosphatase activity of lymphoma CD45 (GP180) is regulated by a direct interaction with the cytoskeleton". Journal of Biological Chemistry, vol. 267, p. 21551-7.
- LU, C., F. Zhu, Y. Y. Cho, F. Tang, T. Zykova, W. Y. Ma, A. M. Bode et Z. Dong. 2006. "Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3". Molecular Cell, vol. 23, p. 121-32.
- LU, H., Q. Hou, T. Zhao, H. Zhang, Q. Zhang, L. Wu et Z. Fan. 2006. "Granzyme M directly cleaves inhibitor of caspase-activated DNase (CAD) to unleash CAD leading to DNA fragmentation". Journal of Immunology, vol. 177, p. 1171-8.

- LUCIANO, F., J. E. Ricci, M. Herrant, C. Bertolotto, B. Mari, J. L. Cousin et P. Auberger. 2002. "T and B leukemic cell lines exhibit different requirements for cell death: correlation between caspase activation, DFF40/DFF45 expression, DNA fragmentation and apoptosis in T cell lines but not in Burkitt's lymphoma". Leukemia, vol. 16, p. 700-7.
- MA, B. Y., K. Yoshida, M. Baba, M. Nonaka, S. Matsumoto, N. Kawasaki, S. Asano et T. Kawasaki. 2008. "The lectin Jacalin induces human B-lymphocyte apoptosis through glycosylation-dependent interaction with CD45". Immunology, vol.
- MAENO, E., Y. Ishizaki, T. Kanaseki, A. Hazama et Y. Okada. 2000. "Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 97, p. 9487-92.
- MAJETI, R., A. M. Bilwes, J. P. Noel, T. Hunter et A. Weiss. 1998. "Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge". Science, vol. 279, p. 88-91.
- MAJETI, R., Z. Xu, T. G. Parslow, J. L. Olson, D. I. Daikh, N. Killeen et A. Weiss. 2000. "An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity". Cell, vol. 103, p. 1059-70.
- MAJUMDER, P. K., N. C. Mishra, X. Sun, A. Bharti, S. Kharbanda, S. Saxena et D. Kufe. 2001. "Targeting of protein kinase C delta to mitochondria in the oxidative stress response". Cell Growth and Differentiation, vol. 12, p. 465-70.
- MARSDEN, V. S. et A. Strasser. 2003. "Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more". Annual Review of Immunology, vol. 21, p. 71-105.
- MARTELLI, A. M., I. Faenza, A. M. Billi, L. Manzoli, C. Evangelisti, F. Fala et L. Cocco. 2006. "Intranuclear 3'-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis?". Cellular Signalling, vol. 18, p. 1101-7.
- MARTELLI, A. M., G. Tabellini, R. Bortul, P. L. Tazzari, A. Cappellini, A. M. Billi et L. Cocco. 2005. "Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway in the resistance to therapeutic treatments of human leukemias". Histology and Histopathology, vol. 20, p. 239-52.
- MASUOKA, J., T. Shiraishi, M. Ichinose, T. Mineta et 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". Japanese Journal of Cancer Research, vol. 92, p. 806-12.
- MATASSA, A. A., L. Carpenter, T. J. Biden, M. J. Humphries et M. E. Reyland. 2001. "PKCdelta is required for mitochondrial-dependent apoptosis in salivary epithelial cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 29719-28.

- MATTSON, M. P. 2000. "Apoptosis in neurodegenerative disorders". Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 1, p. 120-9.
- MAYO, L. D. et D. B. Donner. 2001. "A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 98, p. 11598-603.
- MCCARTY, J. S., S. Y. Toh et P. Li. 1999. "Study of DFF45 in its role of chaperone and inhibitor: two independent inhibitory domains of DFF40 nuclease activity". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 264, p. 176-80.
- MCDONNELL, M. A., M. J. Abedin, M. Melendez, T. N. Platikanova, J. R. Ecklund, K. Ahmed et A. Kelekar. 2008. "Phosphorylation of murine caspase-9 by the protein kinase casein kinase 2 regulates its cleavage by caspase-8". Journal of Biological Chemistry, vol. 283, p. 20149-58.
- MCNEILL, L., R. L. Cassady, S. Sarkardei, J. C. Cooper, G. Morgan et D. R. Alexander. 2004. "CD45 isoforms in T cell signalling and development". Immunology Letters, vol. 92, p. 125-34.
- MEISENHOLDER, G. W., S. J. Martin, D. R. Green, J. Nordberg, B. M. Babior 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.
- MIKOLAJCZYK, J., F. L. Scott, S. Krajewski, D. P. Sutherlin et G. S. Salvesen. 2004. "Activation and substrate specificity of caspase-14". Biochemistry, vol. 43, p. 10560-9.
- MOHAMAD, N., A. Gutierrez, M. Nunez, C. Cocca, G. Martin, G. Cricco, V. Medina, E. Rivera et R. Bergoc. 2005. "Mitochondrial apoptotic pathways". Biocell, vol. 29, p. 149-61.
- MORITA-FUJIMURA, Y., M. Fujimura, Y. Gasche, J. C. Copin et P. H. Chan. 2000. "Overexpression of copper and zinc superoxide dismutase in transgenic mice prevents the induction and activation of matrix metalloproteinases after cold injury-induced brain trauma". Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, vol. 20, p. 130-8.
- MOTOYA, S., K. Kitamura, A. Matsuda, A. L. Maizel, H. Yamamoto et A. Takeda. 1999. "Interaction between CD45-AP and protein-tyrosine kinases involved in T cell receptor signaling". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 1407-14.
- MUKAE, N., M. Enari, H. Sakahira, Y. Fukuda, J. Inazawa, H. Toh et S. Nagata. 1998. "Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, p. 9123-8.

- MUSTELIN, T., S. Williams, P. Taylor, C. Couture, G. Zenner, P. Burn, J. D. Ashwell et A. Altman. 1995. "Regulation of the p70zap tyrosine protein kinase in T cells by the CD45 phosphotyrosine phosphatase". European Journal of Immunology, vol. 25, p. 942-6.
- NAGATA, S. 2000. "Apoptotic DNA fragmentation". Experimental Cell Research, vol. 256, p. 12-8.
- NAKAGAWA, T. et J. Yuan. 2000. "Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis". Journal of Cell Biology, vol. 150, p. 887-94.
- NAKAGAWA, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner et J. Yuan. 2000. "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta". Nature, vol. 403, p. 98-103.
- NEIMANIS, S., W. Albig, D. Doenecke et J. Kahle. 2007. "Sequence elements in both subunits of the DNA fragmentation factor are essential for its nuclear transport". Journal of Biological Chemistry, vol. 282, p. 35821-30.
- NEL, A. E., S. Gupta, L. Lee, J. A. Ledbetter et S. B. Kanner. 1995. "Ligation of the T-cell antigen receptor (TCR) induces association of hSos1, ZAP-70, phospholipase C-gamma 1, and other phosphoproteins with Grb2 and the zeta-chain of the TCR". Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 18428-36.
- NGUYEN, J. T., D. P. Evans, M. Galvan, K. E. Pace, D. Leitenberg, T. N. Bui et L. G. Baum. 2001. "CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans". Journal of Immunology, vol. 167, p. 5697-707.
- NISHIKIMI, A., Y. Kira, E. Kasahara, E. F. Sato, T. Kanno, K. Utsumi et M. Inoue. 2001. "Tributyltin interacts with mitochondria and induces cytochrome c release". Biochemical Journal, vol. 356, p. 621-6.
- NISHIZUKA, Y. 1988. "The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation". Nature, vol. 334, p. 661-5.
- NORAMBUENA, A., C. Metz, L. Vicuna, A. Silva, E. Pardo, C. Oyanadel, A. Gonzalez et A. Soza. 2009. "Galectin-8 induces apoptosis in jurkat T cells by phosphatidic acid-mediated ERK 1/2 activation supported by PKA down regulation". Journal of Biological Chemistry, vol.
- NOVAK, T. J., D. Farber, D. Leitenberg, S. C. Hong, P. Johnson et K. Bottomly. 1994. "Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T cell recognition". Immunity, vol. 1, p. 109-19.
- NUTT, L. K., A. Pataer, J. Pahler, B. Fang, J. Roth, D. J. McConkey et S. G. Swisher. 2002. "Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 9219-25.

- OGIMOTO, M., T. Katagiri, K. Mashima, K. Hasegawa, K. Mizuno et H. Yakura. 1994. "Negative regulation of apoptotic death in immature B cells by CD45". International Immunology, vol. 6, p. 647-54.
- OKADA, Y. et E. Maeno. 2001. "Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels". Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology, vol. 130, p. 377-83.
- OLTVAI, Z. N., C. L. Milliman et S. J. Korsmeyer. 1993. "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death". Cell, vol. 74, p. 609-19.
- OSTERGAARD, H. L. et I. S. Trowbridge. 1991. "Negative regulation of CD45 protein tyrosine phosphatase activity by ionomycin in T cells". Science, vol. 253, p. 1423-5.
- OYADOMARI, S., A. Koizumi, K. Takeda, T. Gotoh, S. Akira, E. Araki et M. Mori. 2002. "Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes". Journal of Clinical Investigation, vol. 109, p. 525-32.
- OZDEMIRLI, M., H. J. Mankin, A. C. Aisenberg et N. L. Harris. 1996. "Hodgkin's disease presenting as a solitary bone tumor. A report of four cases and review of the literature". Cancer, vol. 77, p. 79-88.
- PACE, K. E., C. Lee, P. L. Stewart et L. G. Baum. 1999. "Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1". Journal of Immunology, vol. 163, p. 3801-11.
- PARRISH, J. Z. et D. Xue. 2006. "Cuts can kill: the roles of apoptotic nucleases in cell death and animal development". Chromosoma, vol. 115, p. 89-97.
- PEMBERTON, L. F. et B. M. Paschal. 2005. "Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export". Traffic, vol. 6, p. 187-98.
- PENNINGER, J. M., J. Irie-Sasaki, T. Sasaki et A. J. Oliveira-dos-Santos. 2001. "CD45: new jobs for an old acquaintance". Nat Immunol, vol. 2, p. 389-96.
- PERILLO, N. L., M. E. Marcus et L. G. Baum. 1998. "Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death". Journal of Molecular Medicine, vol. 76, p. 402-12.
- PERILLO, N. L., K. E. Pace, J. J. Seilhamer et L. G. Baum. 1995. "Apoptosis of T cells mediated by galectin-1". Nature, vol. 378, p. 736-9.
- PERILLO, N. L., C. H. Uittenbogaart, J. T. Nguyen et L. G. Baum. 1997. "Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes". Journal of Experimental Medicine, vol. 185, p. 1851-8.

- PERSAUD, S. J., P. M. Jones, H. M. Roderigo-Milne, A. M. Buchan et P. E. Squires. 2003. "Calcium-dependent translocation of cytosolic phospholipase A2 in pancreatic beta-cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 300, p. 889-93.
- PETER, M. E., S. Hellbardt, R. Schwartz-Albiez, M. O. Westendorp, H. Walczak, G. Moldenhauer, M. Grell et P. H. Krammer. 1995. "Cell surface sialylation plays a role in modulating sensitivity towards APO-1-mediated apoptotic cell death". Cell Death and Differentiation, vol. 2, p. 163-71.
- PETER, M. E., A. E. Heufelder et M. O. Hengartner. 1997. "Advances in apoptosis research". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 94, p. 12736-7.
- PETROS, A. M., E. T. Olejniczak et S. W. Fesik. 2004. "Structural biology of the Bcl-2 family of proteins". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1644, p. 83-94.
- PINTON, P., C. Giorgi, R. Siviero, E. Zecchini et R. Rizzuto. 2008. "Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis". Oncogene, vol. 27, p. 6407-18.
- PORTER, F. W. et A. C. Palmenberg. 2009. "Leader-induced phosphorylation of nucleoporins correlates with nuclear trafficking inhibition by cardioviruses". Journal of Virology, vol. 83, p. 1941-51.
- PROSKURYAKOV, S. Y., A. G. Konoplyannikov et V. L. Gabai. 2003. "Necrosis: a specific form of programmed cell death?". Experimental Cell Research, vol. 283, p. 1-16.
- PROSTKO, C. R., M. A. Brostrom, E. M. Malara et C. O. Brostrom. 1992. "Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 alpha and inhibition of eIF-2B in GH3 pituitary cells by perturbants of early protein processing that induce GRP78". Journal of Biological Chemistry, vol. 267, p. 16751-4.
- RABINOVICH, G. A., R. E. Ramhorst, N. Rubinstein, A. Corigliano, M. C. Daroqui, E. B. Kier-Joffe et L. Fainboim. 2002. "Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms". Cell Death and Differentiation, vol. 9, p. 661-70.
- RAFFRAY, M. et G. M. Cohen. 1993. "Thymocyte apoptosis as a mechanism for tributyltin-induced thymic atrophy in vivo". Archives of Toxicology, vol. 67, p. 231-6.
- RAO, N., S. Miyake, A. L. Reddi, P. Douillard, A. K. Ghosh, I. L. Dodge, P. Zhou, N. D. Fernandes et H. Band. 2002. "Negative regulation of Lck by Cbl ubiquitin ligase". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 99, p. 3794-9.

- RAO, R. V., S. Castro-Obregon, H. Frankowski, M. Schuler, V. Stoka, G. del Rio, D. E. Bredesen et H. M. Ellerby. 2002. "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 21836-42.
- RAO, R. V., E. Hermel, S. Castro-Obregon, G. del Rio, L. M. Ellerby, H. M. Ellerby et D. E. Bredesen. 2001. "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation". Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 33869-74.
- RASOLA, A., D. Farahi Far, P. Hofman et B. Rossi. 1999. "Lack of internucleosomal DNA fragmentation is related to Cl(-) efflux impairment in hematopoietic cell apoptosis". FASEB Journal, vol. 13, p. 1711-23.
- RATEI, R., C. Sperling, L. Karawajew, G. Schott, M. Schrappe, J. Harbott, H. Riehm et W. D. Ludwig. 1998. "Immunophenotype and clinical characteristics of CD45-negative and CD45-positive childhood acute lymphoblastic leukemia". Annals of Hematology, vol. 77, p. 107-14.
- RATHMELL, J. C. et C. B. Thompson. 1999. "The central effectors of cell death in the immune system". Annual Review of Immunology, vol. 17, p. 781-828.
- RATHMELL, J. C. et C. B. Thompson. 2002. "Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease". Cell, vol. 109 Suppl, p. S97-107.
- RAVICHANDRAN, K. S. 2003. "'Recruitment signals' from apoptotic cells: invitation to a quiet meal". Cell, vol. 113, p. 817-20.
- RAY, C. A., R. A. Black, S. R. Kronheim, T. A. Greenstreet, P. R. Sleath, G. S. Salvesen et D. J. Pickup. 1992. "Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme". Cell, vol. 69, p. 597-604.
- REH, S., C. Korn, O. Gimadutdinow et G. Meiss. 2005. "Structural basis for stable DNA complex formation by the caspase-activated DNase". Journal of Biological Chemistry, vol. 280, p. 41707-15.
- REN, J., R. Datta, H. Shioya, Y. Li, E. Oki, V. Biedermann, A. Bharti et D. Kufe. 2002. "p73beta is regulated by protein kinase Cdelta catalytic fragment generated in the apoptotic response to DNA damage". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 33758-65.
- RESH, M. D. 1998. "Fyn, a Src family tyrosine kinase". International Journal of Biochemistry and Cell Biology, vol. 30, p. 1159-62.
- REYLAND, M. E. 2007. "Protein kinase Cdelta and apoptosis". Biochemical Society Transactions, vol. 35, p. 1001-4.

- REYLAND, M. E., S. M. Anderson, A. A. Matassa, K. A. Barzen et D. O. Quissell. 1999. "Protein kinase C delta is essential for etoposide-induced apoptosis in salivary gland acinar cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 19115-23.
- ROBERTSON, J. D., S. Orrenius et B. Zhivotovsky. 2000. "Review: nuclear events in apoptosis". Journal of Structural Biology, vol. 129, p. 346-58.
- ROKUDAI, S., N. Fujita, Y. Hashimoto et T. Tsuruo. 2000. "Cleavage and inactivation of antiapoptotic Akt/PKB by caspases during apoptosis". Journal of Cellular Physiology, vol. 182, p. 290-6.
- RON, D. et J. F. Habener. 1992. "CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription". Genes and Development, vol. 6, p. 439-53.
- ROSHAL, M., Y. Zhu et V. Planelles. 2001. "Apoptosis in AIDS". Apoptosis, vol. 6, p. 103-16.
- ROY, N., Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen et J. C. Reed. 1997. "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases". EMBO Journal, vol. 16, p. 6914-25.
- RUVOLO, P. P., X. Deng et W. S. May. 2001. "Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis". Leukemia, vol. 15, p. 515-22.
- RYAN, K. M., M. K. Ernst, N. R. Rice et K. H. Vousden. 2000. "Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death". Nature, vol. 404, p. 892-7.
- SAKAHIRA, H. et S. Nagata. 2002. "Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 3364-70.
- SALLES-PASSADOR, I., A. Fotedar et R. Fotedar. 1999. "Cellular response to DNA damage. Link between p53 and DNA-PK". Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie, vol. 322, p. 113-20.
- SAMEJIMA, K. et 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". Experimental Cell Research, vol. 255, p. 314-20.
- SAMEJIMA, K. et W. C. Earnshaw. 1998. "ICAD/DFF regulator of apoptotic nuclease is nuclear". Experimental Cell Research, vol. 243, p. 453-9.
- SATO, T., S. Irie, S. Kitada et J. C. Reed. 1995. "FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas". Science, vol. 268, p. 411-5.

- SATTLER, M., H. Liang, D. Nettekheim, R. P. Meadows, J. E. Harlan, M. Eberstadt, H. S. Yoon, S. B. Shuker, B. S. Chang, A. J. Minn, C. B. Thompson et S. W. Fesik. 1997. "Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis". Science, vol. 275, p. 983-6.
- SCAFFIDI, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Kramer et M. E. Peter. 1998. "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways". EMBO Journal, vol. 17, p. 1675-87.
- SCAFFIDI, C., I. Schmitz, P. H. Kramer et M. E. Peter. 1999. "The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 1541-8.
- SCAFFIDI, C., I. Schmitz, J. Zha, S. J. Korsmeyer, P. H. Kramer et M. E. Peter. 1999. "Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 22532-8.
- SCHOLZ, S. R., C. Korn, O. Gimadutdinow, M. Knoblauch, A. Pingoud et 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, p. 3045-51.
- SCHRAVEN, B. et M. E. Peter. 1995. "APO-1(CD95)-mediated apoptosis in Jurkat cells does not involve src kinases or CD45". FEBS Letters, vol. 368, p. 491-4.
- SCHRECK, R., P. Rieber et P. A. Baeuerle. 1991. "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1". EMBO Journal, vol. 10, p. 2247-58.
- SCHUTZE, S., V. Tchikov et W. Schneider-Brachert. 2008. "Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization". Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 9, p. 655-62.
- SCOTT, R. C., G. Juhasz et T. P. Neufeld. 2007. "Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death". Current Biology, vol. 17, p. 1-11.
- SEAVITT, J. R., L. S. White, K. M. Murphy, D. Y. Loh, R. M. Perlmutter et M. L. Thomas. 1999. "Expression of the p56(Lck) Y505F mutation in CD45-deficient mice rescues thymocyte development". Molecular and Cellular Biology, vol. 19, p. 4200-8.
- SEGAL-BENDIRDJIAN, E., C. Dudognon, J. Mathieu, J. Hillion et F. Besancon. 2005. "[Cell death signalling: recent advances and therapeutic application]". Bull Cancer, vol. 92, p. 23-35.
- SGROI, D., G. A. Koretzky et I. Stamenkovic. 1995. "Regulation of CD45 engagement by the B-cell receptor CD22". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 92, p. 4026-30.

- SGROI, D., A. Varki, S. Braesch-Andersen et I. Stamenkovic. 1993. "CD22, a B cell-specific immunoglobulin superfamily member, is a sialic acid-binding lectin". Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 7011-8.
- SHAHAM, S. et H. R. Horvitz. 1996. "An alternatively spliced *C. elegans* ced-4 RNA encodes a novel cell death inhibitor". Cell, vol. 86, p. 201-8.
- SHARIF-ASKARI, E., A. Alam, E. Rheaume, P. J. Beresford, C. Scotto, K. Sharma, D. Lee, W. E. DeWolf, M. E. Nuttall, J. Lieberman et R. P. Sekaly. 2001. "Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation". EMBO Journal, vol. 20, p. 3101-13.
- SHEDLOCK, D. J., D. Hwang, A. Y. Choo, C. W. Chung, K. Muthumani et D. B. Weiner. 2008. "HIV-1 viral genes and mitochondrial apoptosis". Apoptosis, vol. 13, p. 1088-99.
- SHIM, D., H. Y. Kang, B. W. Jeon, S. S. Kang, S. I. Chang et H. Y. Kim. 2004. "Protein kinase B inhibits apoptosis induced by actinomycin D in ECV304 cells through phosphorylation of caspase 8". Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 425, p. 214-20.
- SIDOTI-DE FRAISSE, C., V. Rincheval, Y. Risler, B. Mignotte et J. L. Vayssiere. 1998. "TNF-alpha activates at least two apoptotic signaling cascades". Oncogene, vol. 17, p. 1639-51.
- SMAILI, S. S., Y. T. Hsu, A. C. Carvalho, T. R. Rosenstock, J. C. Sharpe et R. J. Youle. 2003. "Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling". Brazilian Journal of Medical and Biological Research, vol. 36, p. 183-90.
- SNOW, D. M. et G. W. Hart. 1998. "Nuclear and cytoplasmic glycosylation". International Review of Cytology, vol. 181, p. 43-74.
- SOUTOGLOU, E., N. Katrakili et I. Talianidis. 2000. "Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels". Molecular Cell, vol. 5, p. 745-51.
- SPILIANAKIS, C., J. Papamatheakis et A. Kretsovali. 2000. "Acetylation by PCAF enhances CIITA nuclear accumulation and transactivation of major histocompatibility complex class II genes". Molecular and Cellular Biology, vol. 20, p. 8489-98.
- SRINIVASULA, S. M., P. Datta, X. J. Fan, T. Fernandes-Alnemri, Z. Huang et E. S. Alnemri. 2000. "Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 36152-7.
- STEINMAN, H. M. 1995. "The Bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant". Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 3487-90.

- STEPHANOU, A. et D. S. Latchman. 2003. "STAT-1: a novel regulator of apoptosis". International Journal of Experimental Pathology, vol. 84, p. 239-44.
- STILLMAN, B. N., D. K. Hsu, M. Pang, C. F. Brewer, P. Johnson, F. T. Liu et L. G. Baum. 2006. "Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death". Journal of Immunology, vol. 176, p. 778-89.
- STOVER, D. R., H. Charbonneau, N. K. Tonks et K. A. Walsh. 1991. "Protein-tyrosine-phosphatase CD45 is phosphorylated transiently on tyrosine upon activation of Jurkat T cells". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 88, p. 7704-7.
- STRIDH, H., M. Kimland, D. P. Jones, S. Orrenius et M. B. Hampton. 1998. "Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis". FEBS Letters, vol. 429, p. 351-5.
- STRIDH, H., S. Orrenius et M. B. Hampton. 1999. "Caspase involvement in the induction of apoptosis by the environmental toxicants tributyltin and triphenyltin". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 156, p. 141-6.
- SUZUKI, M., R. J. Youle et N. Tjandra. 2000. "Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization". Cell, vol. 103, p. 645-54.
- SYMONS, A., D. N. Cooper et A. N. Barclay. 2000. "Characterization of the interaction between galectin-1 and lymphocyte glycoproteins CD45 and Thy-1". Glycobiology, vol. 10, p. 559-63.
- SYMONS, A., A. C. Willis et A. N. Barclay. 1999. "Domain organization of the extracellular region of CD45". Protein Engineering, vol. 12, p. 885-92.
- SZABO, I., E. Gulbins, H. Apfel, X. Zhang, P. Barth, A. E. Busch, K. Schlottmann, O. Pongs et F. Lang. 1996. "Tyrosine phosphorylation-dependent suppression of a voltage-gated K⁺ channel in T lymphocytes upon Fas stimulation". Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 20465-9.
- SZABO, I., A. Lepple-Wienhues, K. N. Kaba, M. Zoratti, E. Gulbins et F. Lang. 1998. "Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, p. 6169-74.
- TAIT, S. W. et D. R. Green. 2008. "Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut". Oncogene, vol. 27, p. 6452-61.
- TAKAHASHI, R., Q. Deveraux, I. Tamm, K. Welsh, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen et J. C. Reed. 1998. "A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 7787-90.

- TAKEDA, A., J. J. Wu et A. L. Maizel. 1992. "Evidence for monomeric and dimeric forms of CD45 associated with a 30-kDa phosphorylated protein". Journal of Biological Chemistry, vol. 267, p. 16651-9.
- TANG, M. K., A. K. Leung, W. H. Kwong, P. H. Chow, J. Y. Chan, V. Ngo-Muller, M. Li et K. K. Lee. 2000. "Bmp-4 requires the presence of the digits to initiate programmed cell death in limb interdigital tissues". Developmental Biology, vol. 218, p. 89-98.
- TATOSYAN, A. G. et O. A. Mizenina. 2000. "Kinases of the Src family: structure and functions". Biochemistry, vol. 65, p. 49-58.
- THOMAS, D. A., C. Du, M. Xu, X. Wang et T. J. Ley. 2000. "DFP45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis". Immunity, vol. 12, p. 621-32.
- THOMAS, M. L. et E. J. Brown. 1999. "Positive and negative regulation of Src-family membrane kinases by CD45". Immunology Today, vol. 20, p. 406-11.
- THOMAS, S. M. et J. S. Brugge. 1997. "Cellular functions regulated by Src family kinases". Annual Review of Cell and Developmental Biology, vol. 13, p. 513-609.
- THOMPSON, C. B. 1995. "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease". Science, vol. 267, p. 1456-62.
- THOMPSON, T. A., J. M. Lewis, N. S. Dejneka, W. B. Severs, R. Polavarapu et M. L. Billingsley. 1996. "Induction of apoptosis by organotin compounds in vitro: neuronal protection with antisense oligonucleotides directed against stannin". Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 276, p. 1201-16.
- THORNBERRY, N. A. et Y. Lazebnik. 1998. "Caspases: enemies within". Science, vol. 281, p. 1312-6.
- TINEL, A. et J. Tschopp. 2004. "The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress". Science, vol. 304, p. 843-6.
- TING, J. P., S. B. Willingham et D. T. Bergstralh. 2008. "NLRs at the intersection of cell death and immunity". Nat Rev Immunol, vol. 8, p. 372-9.
- TITTEL, J. N. et H. Steller. 2000. "A comparison of programmed cell death between species". Genome Biol, vol. 1, p. REVIEWS0003.
- TORRES, J., J. Rodriguez, M. P. Myers, M. Valiente, J. D. Graves, N. K. Tonks et R. Pulido. 2003. "Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions". Journal of Biological Chemistry, vol. 278, p. 30652-60.

- TROWBRIDGE, I. S. et M. L. Thomas. 1994. "CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development". Annual Review of Immunology, vol. 12, p. 85-116.
- TSUJIMOTO, Y. 2003. "Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria". Journal of Cellular Physiology, vol. 195, p. 158-67.
- TSUJIMOTO, Y. et C. M. Croce. 1986. "Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 83, p. 5214-8.
- TZIVION, G., Y. H. Shen et J. Zhu. 2001. "14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding". Oncogene, vol. 20, p. 6331-8.
- USHIO-FUKAI, M., R. W. Alexander, M. Akers, Q. Yin, Y. Fujio, K. Walsh et K. K. Griendling. 1999. "Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 22699-704.
- VAN DELFT, M. F. et D. C. Huang. 2006. "How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis". Cell Research, vol. 16, p. 203-13.
- VAN GURP, M., N. Festjens, G. van Loo, X. Saelens et P. Vandenabeele. 2003. "Mitochondrial intermembrane proteins in cell death". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 304, p. 487-97.
- VAN LEEUWEN, J. E. et L. E. Samelson. 1999. "T cell antigen-receptor signal transduction". Current Opinion in Immunology, vol. 11, p. 242-8.
- VANDER HEIDEN, M. G. et C. B. Thompson. 1999. "Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?". Nat Cell Biol, vol. 1, p. E209-16.
- VASILEVSKAYA, I. et P. J. O'Dwyer. 2003. "Role of Jun and Jun kinase in resistance of cancer cells to therapy". Drug Resist Updat, vol. 6, p. 147-56.
- VAZQUEZ, A., E. E. Bond, A. J. Levine et G. L. Bond. 2008. "The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy". Nat Rev Drug Discov, vol. 7, p. 979-87.
- VERHAGEN, A. M. et D. L. Vaux. 2002. "Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac". Apoptosis, vol. 7, p. 163-6.
- VESPA, G. N., L. A. Lewis, K. R. Kozak, M. Moran, J. T. Nguyen, L. G. Baum et M. C. Miceli. 1999. "Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation". Journal of Immunology, vol. 162, p. 799-806.
- VIRTS, E., D. Barritt et W. C. Raschke. 1998. "Expression of CD45 isoforms lacking exons 7, 8 and 10". Molecular Immunology, vol. 35, p. 167-76.

- VISWANATH, V., Y. Wu, R. Boonplueang, S. Chen, F. F. Stevenson, F. Yantiri, L. Yang, M. F. Beal et J. K. Andersen. 2001. "Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease". Journal of Neuroscience, vol. 21, p. 9519-28.
- VOSS, O. H., S. Kim, M. D. Wewers et A. I. Doseff. 2005. "Regulation of monocyte apoptosis by the protein kinase Cdelta-dependent phosphorylation of caspase-3". Journal of Biological Chemistry, vol. 280, p. 17371-9.
- VOUSDEN, K. H. et X. Lu. 2002. "Live or let die: the cell's response to p53". Nat Rev Cancer, vol. 2, p. 594-604.
- WADA, J., K. Ota, A. Kumar, E. I. Wallner et Y. S. Kanwar. 1997. "Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin". Journal of Clinical Investigation, vol. 99, p. 2452-61.
- WALKER, P. R., J. Leblanc, B. Smith, S. Pandey et M. Sikorska. 1999. "Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis". Methods, vol. 17, p. 329-38.
- WALLACE, V. A., W. P. Fung-Leung, E. Timms, D. Gray, K. Kishihara, D. Y. Loh, J. Penninger et T. W. Mak. 1992. "CD45RA and CD45RB^{high} expression induced by thymic selection events". Journal of Experimental Medicine, vol. 176, p. 1657-63.
- WALZEL, H., U. Schulz, P. Neels et J. Brock. 1999. "Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45". Immunology Letters, vol. 67, p. 193-202.
- WANG, C. Y., M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel et 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, p. 1680-3.
- WANG, H., Y. Zhao, L. Li, M. A. McNutt, L. Wu, S. Lu, Y. Yu, W. Zhou, J. Feng, G. Chai, Y. Yang et W. G. Zhu. 2008. "An ATM- and Rad3-related (ATR) signaling pathway and a phosphorylation-acetylation cascade are involved in activation of p53/p21Waf1/Cip1 in response to 5-aza-2'-deoxycytidine treatment". Journal of Biological Chemistry, vol. 283, p. 2564-74.
- WANG, X. Z., B. Lawson, J. W. Brewer, H. Zinszner, A. Sanjay, L. J. Mi, R. Boorstein, G. Kreibich, L. M. Hendershot et D. Ron. 1996. "Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153)". Molecular and Cellular Biology, vol. 16, p. 4273-80.
- WANG, Y., W. Guo, L. Liang et W. J. Esselman. 1999. "Phosphorylation of CD45 by casein kinase 2. Modulation of activity and mutational analysis". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 7454-61.

- WEAVER, C. T., J. T. Pingel, J. O. Nelson et 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". Molecular and Cellular Biology, vol. 11, p. 4415-22.
- WEIL, R. et A. Israel. 2006. "Deciphering the pathway from the TCR to NF-kappaB". Cell Death and Differentiation, vol. 13, p. 826-33.
- WEST, J. D., C. Ji et L. J. Marnett. 2005. "Modulation of DNA fragmentation factor 40 nuclease activity by poly(ADP-ribose) polymerase-1". Journal of Biological Chemistry, vol. 280, p. 15141-7.
- WESTENDORP, M. O., R. Frank, C. Ochsenbauer, K. Stricker, J. Dhein, H. Walczak, K. M. Debatin et P. H. Krammer. 1995. "Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120". Nature, vol. 375, p. 497-500.
- WIDLAK, P. 2000. "The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis". Acta Biochimica Polonica, vol. 47, p. 1037-44.
- WIDLAK, P. et W. T. Garrard. 2006. "The apoptotic endonuclease DFF40/CAD is inhibited by RNA, heparin and other polyanions". Apoptosis, vol. 11, p. 1331-7.
- WIDLAK, P. et W. T. Garrard. 2005. "Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G". Journal of Cellular Biochemistry, vol. 94, p. 1078-87.
- WIDLAK, P. et W. T. Garrard. 2001. "Ionic and cofactor requirements for the activity of the apoptotic endonuclease DFF40/CAD". Molecular and Cellular Biochemistry, vol. 218, p. 125-30.
- WIDLAK, P. et W. T. Garrard. 2009. "Roles of the major apoptotic nuclease-DNA fragmentation factor-in biology and disease". Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 66, p. 263-74.
- WIDLAK, P., J. Lanuszewska, R. B. Cary et W. T. Garrard. 2003. "Subunit structures and stoichiometries of human DNA fragmentation factor proteins before and after induction of apoptosis". Journal of Biological Chemistry, vol. 278, p. 26915-22.
- WIDLAK, P., P. Li, X. Wang et W. T. Garrard. 2000. "Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 8226-32.
- WONG, W. W. et H. Puthalakath. 2008. "Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway". IUBMB Life, vol. 60, p. 390-7.
- WOO, E. J., Y. G. Kim, M. S. Kim, W. D. Han, S. Shin, H. Robinson, S. Y. Park et B. H. Oh. 2004. "Structural mechanism for inactivation and activation of CAD/DFF40 in the apoptotic pathway". Molecular Cell, vol. 14, p. 531-9.

- WU, H. W., H. F. Li, X. Y. Wu, J. Zhao et J. Guo. 2008. "Reactive oxygen species mediate ERK activation through different Raf-1-dependent signaling pathways following cerebral ischemia". Neuroscience Letters, vol. 432, p. 83-7.
- XU, Z. et A. Weiss. 2002. "Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms". Nat Immunol, vol. 3, p. 764-71.
- YAMADA, A., M. Streuli, H. Saito, D. M. Rothstein, S. F. Schlossman et C. Morimoto. 1990. "Effect of activation of protein kinase C on CD45 isoform expression and CD45 protein tyrosine phosphatase activity in T cells". European Journal of Immunology, vol. 20, p. 1655-60.
- YAMAGUCHI, K., R. Uzzo, N. Dulin, J. H. Finke et V. Kolenko. 2004. "Renal carcinoma cells undergo apoptosis without oligonucleosomal DNA fragmentation". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 318, p. 710-3.
- YANG, C. et M. G. Kazanietz. 2003. "Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC". Trends in Pharmacological Sciences, vol. 24, p. 602-8.
- YANG, H., L. Qu, J. Ni, M. Wang et Y. Huang. 2008. "Palmitoylation participates in G protein coupled signal transduction by affecting its oligomerization". Molecular Membrane Biology, vol. 25, p. 58-71.
- YANG, Q. H., R. Church-Hajduk, J. Ren, M. L. Newton et C. Du. 2003. "Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis". Genes and Development, vol. 17, p. 1487-96.
- YANG, X., R. Khosravi-Far, H. Y. Chang et D. Baltimore. 1997. "Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis". Cell, vol. 89, p. 1067-76.
- YIN, X. M., Y. Luo, G. Cao, L. Bai, W. Pei, D. K. Kuharsky et J. Chen. 2002. "Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 42074-81.
- YONEDA, T., K. Imaizumi, K. Oono, D. Yui, F. Gomi, T. Katayama et M. Tohyama. 2001. "Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress". Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 13935-40.
- YOSHIDA, K., H. Liu et Y. Miki. 2006. "Protein kinase C delta regulates Ser46 phosphorylation of p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage". Journal of Biological Chemistry, vol. 281, p. 5734-40.
- YOSHIDA, K., Y. Miki et D. Kufe. 2002. "Activation of SAPK/JNK signaling by protein kinase Cdelta in response to DNA damage". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 48372-8.

- YOSHIDA, K., H. G. Wang, Y. Miki et D. Kufe. 2003. "Protein kinase Cdelta is responsible for constitutive and DNA damage-induced phosphorylation of Rad9". EMBO Journal, vol. 22, p. 1431-41.
- YOSHIZUMI, M., J. Abe, J. Haendeler, Q. Huang et B. C. Berk. 2000. "Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 11706-12.
- YU, H., I. Lee, A. R. Salomon, K. Yu et M. Huttemann. 2008. "Mammalian liver cytochrome c is tyrosine-48 phosphorylated in vivo, inhibiting mitochondrial respiration". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1777, p. 1066-71.
- YUAN, J., S. Shaham, S. Ledoux, H. M. Ellis et 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, p. 641-52.
- ZHA, H., C. Aime-Sempe, T. Sato et J. C. Reed. 1996. "Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2". Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 7440-4.
- ZHA, J., H. Harada, K. Osipov, J. Jockel, G. Waksman et S. J. Korsmeyer. 1997. "BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity". Journal of Biological Chemistry, vol. 272, p. 24101-4.
- ZHA, J., H. Harada, E. Yang, J. Jockel et S. J. Korsmeyer. 1996. "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, p. 619-28.
- ZHANG, J., X. Liu, D. C. Scherer, L. van Kaer, X. Wang et M. Xu. 1998. "Resistance to DNA fragmentation and chromatin condensation in mice lacking the DNA fragmentation factor 45". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, p. 12480-5.
- ZHANG, M., Y. Li, H. Zhang et S. Xue. 2001. "BAPTA blocks DNA fragmentation and chromatin condensation downstream of caspase-3 and DFF activation in HT-induced apoptosis in HL-60 cells". Apoptosis, vol. 6, p. 291-7.
- ZHOU, P., A. A. Lugovskoy, J. S. McCarty, P. Li et G. Wagner. 2001. "Solution structure of DFF40 and DFF45 N-terminal domain complex and mutual chaperone activity of DFF40 and DFF45". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 98, p. 6051-5.
- ZHU, J., F. Shibasaki, R. Price, J. C. Guillemot, T. Yano, V. Dotsch, G. Wagner, P. Ferrara et F. McKeon. 1998. "Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1". Cell, vol. 93, p. 851-61.