

Université du Québec  
INRS-Institut-Armand-Frappier

**MÉCANISMES D'INDUCTION DE L'APOPTOSE PAR LE TRIBUTYLÉTAÏN:  
IMPLICATION DU CD45 DANS LE PROCESSUS D'APOPTOSE NUCLÉAIRE**

Par  
Philippe Desharnais

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

Jury d'évaluation

Président du jury  
et examinateur interne

Dr. Daniel Cyr, INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Dr. Michel Tremblay, CHUL, Québec

Directeur de recherche

Dr. Jacques Bernier, INRS-Institut Armand-Frappier



## Table des matières

LISTE DES ABBRÉVIATIONS .....	IV
LISTE DES FIGURES .....	VII
SOMMAIRE .....	VIII
INTRODUCTION .....	1
<b>SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE .....</b>	<b>3</b>
<b>CHAPITRE 1 : L'APOPTOSE .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 INTRODUCTION.....</b>	<b>4</b>
1.1.1 ÉLIMINATION DES CELLULES APOPTOTIQUES .....	6
<b>1.2 RÔLE DE LA MITOCHONDRIE DANS L'APOPTOSE.....</b>	<b>7</b>
1.2.1 RÉGULATION PAR LES MEMBRES DE LA FAMILLE DE BCL-2 .....	7
1.2.2 TRANSITION DU POTENTIEL MITOCHONDRIAL .....	10
<b>1.3 LES CASPASES: PROTÉASES EXÉCUTRICES DE L'APOPTOSE.....</b>	<b>13</b>
1.3.1 ACTIVATION DES CASPASES.....	15
1.3.1.1 VOIE DE LA MITOCHONDRIE.....	15
1.3.1.2 VOIE DES RÉCEPTEURS DE MORT .....	17
1.3.2 RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ DES CASPASES .....	19
<b>1.4 DÉGRADATION NUCLÉAIRE LORS DE LA MORT CELLULAIRE.....</b>	<b>22</b>
<b>CHAPITRE 2 : VOIES DE SIGNALISATION ET APOPTOSE : RELATION AVEC LE CD45 .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 CASCADE D'ÉVÉNEMENTS MENANT À L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 ÉVÉNEMENTS DE SIGNALISATION IMPLIQUÉS DANS L'APOPTOSE.....</b>	<b>30</b>
2.2.1 SIGNALISATION PROAPOPTOTIQUE .....	31
2.2.2 SIGNALISATION ANTIAPOPTOTIQUE.....	32
<b>2.3 LE CD45.....</b>	<b>33</b>
2.3.1 STRUCTURE ET ISOFORME.....	33
2.3.2. RÔLE DANS LES CELLULES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	34
2.3.2.1. IMPORTANCE DES DIFFÉRENTS DOMAINES STRUCTURAUX DU CD45 .....	35
2.3.2.2 RÉGULATION DES MEMBRES DE LA FAMILLE SRC.....	37
2.3.2.3. AUTRES SUBSTRATS DU CD45 .....	38
2.4. IMPLICATION DU CD45 DANS L'APOPTOSE.....	38
<b>CHAPITRE 3 : LES ORGANOÉTAIENS .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1 UTILISATIONS DES ORGANOÉTAIENS .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2 CONTAMINATION DE L'ENVIRONNEMENT.....</b>	<b>41</b>
3.2.1 LÉGISLATION SUR LE TBT ET PRÉSENCE DANS L'ENVIRONNEMENT .....	42
3.2.2 LE DEVENIR DU TBT DANS L'EAU.....	43
3.2.3 BIOACCUMULATION DU TBT ET EXPOSITION DES HUMAINS VIA LA DIÈTE.....	44
<b>3.3 TOXICITÉ CHEZ LES MAMMIFÈRES.....</b>	<b>45</b>
3.3.1 MÉCANISME D'ACTION DU TBT.....	45
3.3.2 INTERACTION AVEC LES MEMBRANES ET LES PROTÉINES.....	46
3.3.3. PERTURBATIONS AU NIVEAU DE LA MITOCHONDRIE.....	47
3.3.4. ALTÉRATION GÉNÉRALE DE L'HOMÉOSTASIE IONIQUE DE LA CELLULE.....	48

3.3.5. EFFETS AU NIVEAU DE LA SIGNALISATION CELLULAIRE ET DE L'EXPRESSION GÉNIQUE .....	49
<b>3.4. IMMUNOTOXICITÉ INDUITE PAR LE TBT.....</b>	<b>51</b>
3.4.1 TOXICITÉ GÉNÉRALE SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE .....	51
3.4.2 TOXICITÉ SUR LES THYMOCYTES ET LYMPHOCYTES T .....	52
3.4.3 CARACTÉRISATION DE L'IMMUNOTOXICITÉ AU NIVEAU DU THYMUS.....	52
3.4.4. MÉCANISME D'INDUCTION DE L'APOPTOSE .....	54
<b>SECTION 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE.....</b>	<b>58</b>
<b>UNEXPECTED INVOLVEMENT OF THE CD45 IN THE APOPTOSIS INDUCED BY MITOCHONDRIAL PERTURBATING AGENTS .....</b>	<b>58</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>97</b>
<b>LISTE DES RÉFÉRENCES.....</b>	<b>105</b>

## Liste des abréviations

$\Delta\Psi_m$  : gradient électrochimique transmembranaire de la mitochondrie  
 $H_2O_2$  : Peroxyde d'hydrogène  
 AA : Acide arachidonique  
 ADN : Acide déoxyribonucléique  
 ADP : Adénosine diphosphate  
 AICD : Activation-Induced Cell Death/ Mort cellulaire induite par l'activation  
 AIF : Apoptosis-inducing factor/ Facteur d'induction d'apoptose  
 ANT : Adenine nucleotide translocator/ Translocateur à nucléotide adénine  
 APAF-1 : Apoptotic protease-activating-factor 1/ Facteur d'activation 1 de protéase apoptotique  
 ARN : Acide Ribonucléique  
 ATCC : American Type Culture Collection  
 ATP : Adénosine triphosphate  
 BCR : B cell receptor/ Récepteurs des lymphocytes B  
 BH : Bcl-2 homology region/ Région homologue à Bcl-2  
 BIR : Baculoviral IAP repeat/ Motif IAP baculoviral  
 CAD : Caspase Activating DNase/ DNase activée par les caspases  
 CED : Caenorhabditis elegans death gene/ Gène de mort de Caenorhabditis elegans  
 CARD : Caspase recruitment domain/ Domaine de recrutement des caspases  
 Caspase : Cystéine aspartate protéase/ Protéase cystéine aspartate  
 CD45-AP : CD45-associated protein/ Protéine associée au CD45  
 CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité  
 Da : Dalton  
 DAG : Diacylglycérol  
 DBT : Dibutylétain  
 DED : Death effector domain/ Domaine exécuteur de mort  
 DFF : DNA fragmentation factor/ Facteur de fragmentation de l'ADN  
 DISC : Death-inducing signalling complex/ Complexe de signalisation inducteur de mort  
 DM : Domaine de mort  
 DR : Death Receptor/ Récepteur de mort  
 EGF : Epidermal growth factor/ Facteur de croissance épidermal  
 ERK : Extracellular regulated kinase/ Kinase régulée par l'extérieur  
 FADD : Fas-associated-protein with death domain/ Protéine associée à Fas avec un  
 Domaine de mort  
 FasL : Fas-ligand/ Ligand de Fas  
 fn3 : Domaine fibronectine de type III  
 GAP : GTPases activating proteins/ Protéines d'activation des GTPases  
 GDP : Guanosine diphosphate  
 GTP : Guanosine triphosphate  
 IAP : Inhibitor of apoptosis protein/ Protéines inhibitrice d'apoptose  
 ICAD : Inhibitor of Caspase Activating DNase/ Inhibiteur de la DNase activée par les  
 caspases  
 ICE : Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme/ Enzyme de conversion de l'interleukine 1 $\beta$   
 Ig : Immunoglobuline  
 IL : Interleukine

IP<sub>3</sub> : Inositol triphosphate  
 ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs/ Motifs d'activation de tyrosine situés sur les immunorécepteurs  
 JNK : Jun kinase/ Kinase Jun  
 Kpb : Kilo paires de bases  
 LAT : Linker for activation of T cells/ Éditeur de lien pour l'activation des cellules T  
 LOAEL : Lowest observed adverse effect level/ Dose minimale induisant un effet nocif observé  
 LOEL : Lowest observed effect level/ Dose minimale induisant l'effet observé  
 MAPK : Mitogen-activated protein kinase/ Protéine kinase activée par des mitogènes  
 MBT : Monobutylétain  
 MEK : MAPK/ERK kinase  
 MEKK-1 : MAPK/ERK kinase kinase-1  
 Mpb : Méga paires de bases  
 NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor- $\kappa$ B/ Facteur Nucléaire- $\kappa$ B  
 NF-AT : Nuclear Factor of Activated T cells/ Facteur nucléaire des cellules T activées  
 NK : Natural Killer  
 NOAEL : No Observed Adverse Effect Level/ Dose sans effets nocif observés  
 NOEL : No Observed Effect Level/ Dose sans effets observés  
 PARP : Poly(ADP-ribose) polymerase/ Polymérase Poly(ADP-ribose)  
 pb : paire(s) de bases  
 PBL : Peripheral Blood Lymphocytes/ Lymphocytes sanguins périphériques  
 PFGE : Pulse-Field Gel Electrophoresis/ Électrophorèse en champ pulsé  
 PI : Phosphoinositides  
 PI3K : Phosphatidylinositol-3 kinase  
 PIP2 : Phosphatidylinositol-2 phosphate  
 PK : Protéine kinase  
 PLC- $\gamma$  : Phospholipase C-gamma  
 PLA<sub>2</sub> : Phospholipase A<sub>2</sub>  
 PP2A : Protéine phosphatase 2A  
 RAIDD : RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with a death domain/  
 Protéine homologue à ICH-1/CED-3 associée à RIP avec un domaine de mort  
 RING : Really Interesting New Gene/ Nouveau gène vraiment intéressant  
 RIP : Receptor-interacting protein/ Protéine interagissant avec les récepteurs  
 ROS : Reactive Oxygen Species/ Espèces oxygénées réactives  
 SAPK : Stress-activated protein kinases/ Protéines kinases activées par le stress  
 SH : Src Homology region/ Région d'homologie avec Src  
 SHP-1 : Src Homology 2 domain-containing tyrosine Phosphatase/ Tyrosine Phosphatase contenant des domaines d'homologie 2 à Src  
 TBT : Tributylétain  
 TBTO : Tributyltin Oxyde/ Oxyde de Tributylétain  
 TCR : T cell receptor/ Récepteur des lymphocytes T  
 TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor-  $\beta$ / Facteur de croissance transformant  $\beta$   
 TM : Transmembrane domain/ Domaine transmembranaire  
 TNF : Tumor necrosis factor/ Facteur de nécrose tumorale  
 TNFR : TNF $\alpha$  receptor/ Récepteur de TNF $\alpha$

TPT : Triphénylétain

TRADD : TNF-related associated protein with death domain/ Protéine homologue et associée à TNF avec un domaine de mort

TRAIL : TNF $\alpha$ -related apoptosis-inducing ligand/ Ligand homologue à TNF $\alpha$  inducteur d'apoptose

USEPA : United States Environmental Protection Agency/ Agence de protection de l'environnement des États-Unis

UV : Ultraviolet

VDAC : Voltage-dependent anion channel/ Canal ionique dépendant du voltage

Vpr : Viral proteins/ protéines virales

WHO : World Health Organization/ Organisation Mondiale de la Santé

ZAP-70 : Zeta chain-associated protein of 70 kDa/ Protéine de 70 Kda associée à la Chaîne zeta.

**Liste des figures**

<u>FIGURE 1 : RELATION STRUCTURE-FONCTION DES PROTÉINES MEMBRES DE LA FAMILLE DE BCL-2</u> .....	8
<u>FIGURE 2 : MÉCANISMES POSSIBLES POUR LA PERMÉABILISATION DE LA MEMBRANE INTERNE (IM) OU DE LA MEMBRANE EXTERNE (OM) LORS DE L'INDUCTION D'APOPTOSE</u> .....	11
<u>FIGURE 3 : STRUCTURE DES PROCASPASES ET SITES DE CLIVAGES INTERNES</u> .....	14
<u>FIGURE 4 : DIFFÉRENTES VOIES DE SIGNALISATION APOPTOTIQUE CONVERGENT À L'ACTIVATION DES CASPASES EXÉCUTRICES</u> .....	16
<u>FIGURE 5 : INTERACTIONS MOLÉCULAIRES MENANT À L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T SUITE À LA LIAISON DU TCR</u> .....	29

## Sommaire

Le tributylétain (TBT) est une molécule chimique utilisée dans plusieurs formulations industrielles qui représente un potentiel nocif important pour l'environnement. Des études toxicologiques ont démontré que le TBT engendre des effets toxiques chez plusieurs organismes aquatiques dont les poissons, les crabes, les huîtres et les moules ainsi que chez les mammifères. La structure chimique du TBT lui confère la propriété de diffuser au travers des bicouches lipidiques et d'interagir avec les protéines, ce qui engendre de multiples perturbations au niveau de l'homéostasie cellulaire. Chez les mammifères, le système immunitaire est le plus sensible à l'action du TBT. On y dénote une perte de fonction des lymphocytes T périphériques et une importante déplétion des thymocytes corticaux. Il a été suggéré que l'atrophie du thymus engendrée par l'action du TBT serait causée par une induction de l'apoptose des thymocytes corticaux.

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée qui se déroule à l'intérieur d'un organisme afin d'éliminer les cellules âgées, infectées ou dangereuses. Deux voies principales mènent à l'induction d'apoptose à l'intérieur de la cellule: la voie des récepteurs de mort et la voie de la mitochondrie. La voie des récepteurs de mort implique la liaison des récepteurs faisant partie de la famille du TNFR qui, suite au recrutement de molécules adaptatrices, entraîne l'activation de la caspase-8 qui initie une cascade de caspases en clivant les caspases 3, 6 et 7. La voie de la mitochondrie est directement reliée à une perturbation du potentiel membranaire mitochondrial qui mène à la libération dans le cytoplasme de divers facteurs, dont le cytochrome c et AIF. Ceux-ci sont responsables de l'activation de la caspase-9 qui engendre ensuite l'activation de la cascade de caspases exécutrices procédant au démantèlement de la cellule. La voie de la mitochondrie est induite entre autres par les dommages génotoxiques, les agents anti-néoplasiques et les contaminants environnementaux. Le mode d'induction de l'apoptose par le TBT impliquerait la voie de la mitochondrie. Toutefois, il n'a pas encore été déterminé de cible moléculaire étant responsable de la cytotoxicité du TBT.

La grande importance physiologique du système immunitaire et sa vulnérabilité particulière face à divers xénobiotiques, dont le TBT, sont des facteurs qui ont gouvernés

à l'établissement de l'approche expérimentale qui était de mieux comprendre le mode d'induction de l'apoptose par le TBT chez les lymphocytes, les principales cellules du système immunitaire. Plus spécifiquement, les objectifs de cette étude étaient de déterminer si le CD45, une protéine tyrosine phosphatase transmembranaire essentielle à l'activation des lymphocytes B et T, possédait un rôle à jouer dans le processus d'induction d'apoptose par le TBT et de déterminer à quel niveau de la cascade d'évènements biochimiques se déroulant lors de l'apoptose, le CD45 était impliqué.

Au cours de cette étude, il a été démontré qu'en réponse au TBT, le CD45 est essentiel à l'induction de la condensation de la chromatine et de la fragmentation internucléosomale de l'ADN, deux changements morphologiques finals de la cascade apoptotique. L'analyse des principales perturbations cellulaires induites lors de l'apoptose a permis de déterminer le niveau d'implication du CD45 dans l'induction de ces deux processus. En effet, il est engendré, chez les cellules CD45 positives et CD45 négatives, la mobilisation du calcium à l'intérieur de la cellule, le clivage de I $\kappa$ B- $\alpha$ , la réduction du potentiel membranaire mitochondrial, la libération du cytochrome c dans le cytoplasme, l'activation de la caspase-3 et le clivage du DFF45, l'inhibiteur de l'endonucléase DFF40. Le signal défectif responsable de l'absence d'apoptose nucléaire chez les cellules CD45 négatives impliquerait l'activité des tyrosine kinases et serait localisé au niveau du cytoplasme. De plus, il a été démontré que ce phénomène est spécifiquement relié à l'absence du CD45 et qu'il n'est pas exclusif à l'induction d'apoptose par le TBT.

Ceci est la première étude à faire la démonstration d'un tel rôle pour le CD45 et constitue une nouvelle voie de signalisation apoptotique chez les cellules du système immunitaire. Cette étude constitue également l'une des rares où il est démontré une absence d'apoptose nucléaire en présence de l'activation de la caspase-3. D'autres travaux devront être menés afin de mieux caractériser et définir les éléments modulés par le CD45 responsables de l'induction d'apoptose nucléaire. Toutefois, il semble que cette nouvelle voie de signalisation apoptotique est très prometteuse et pourrait faire l'objet d'intervention thérapeutique.

## Introduction

Le TBT est un polluant environnemental retrouvé dans les eaux et sédiments des régions côtières et portuaires. Ce composé, qui est l'espèce la plus réactive de la famille des organoétains, est principalement utilisé comme agent biocide dans les peintures antisalissures pour bateaux. La structure chimique particulière du TBT lui confère un pouvoir ionique et hydrophobique qui lui permet d'interagir avec les membranes et les protéines. Le TBT diffuse passivement au travers de la bicouche lipidique membranaire et engendre à l'intérieur de la cellule de multiples perturbations homéostatiques dont une inhibition de la synthèse protéique, une déplétion des niveaux d'ATP, une augmentation du calcium à l'intérieur de la cellule, une modification du cytosquelette et une inhibition de la phosphorylation oxydative. Plusieurs études toxicologiques effectuées chez les mammifères ont démontré que le système immunitaire est la cible privilégiée du TBT, celui-ci étant affecté à des doses plus faibles que celles affectant les autres organes. L'immunotoxicité du TBT est caractérisée par l'élimination sélective des thymocytes corticaux et une perte de fonctions des lymphocytes T périphériques. Il a été suggéré que le mécanisme par lequel le TBT entraînerait l'atrophie du thymus serait causé par une stimulation excessive de l'apoptose des thymocytes corticaux. Cependant, bien que plusieurs mécanismes d'action aient été proposés comme étant responsable de la cytotoxicité du TBT, une cible moléculaire reste encore à définir.

Le système immunitaire est particulièrement vulnérable à l'action de plusieurs xénobiotiques, dont le TBT. Le système immunitaire est impliqué dans la protection des organismes contre les agents infectieux, dans le contrôle de la propagation des cellules tumorales et dans les réactions d'autoimmunités. Les effets immunosuppresseurs induits par les agents toxiques peuvent entraîner des infections prolongées, plus sévères et répétées et le développement de cancers. D'autre part, l'activation du système immunitaire par les agents toxiques peut provoquer des réponses d'hypersensibilité et des maladies auto-immunes. Les effets nocifs potentiels résultant de la perturbation de l'équilibre du système immunitaire conjugués avec la grande importance physiologique de celui-ci au sein de l'organisme sont des facteurs démontrant l'utilité de comprendre les conséquences et les modes d'action de ces agresseurs chimiques.

Le mode d'activation des lymphocytes en réponse à un stimuli mitogénique passe par différentes voies biochimiques dont certaines impliquent des tyrosine kinases, des sérine/thréonine kinases et des phosphatases. L'ordre dans lequel ces protéines sont activées de même que leur localisation à l'intérieur de la cellule sont des paramètres très importants dans la transmission adéquate des signaux cellulaires. Le TBT engendre des perturbations au niveau du cytosquelette et des membranes cellulaires. Il est donc possible que cela puisse affecter l'association de certaines protéines impliquées dans l'activation des lymphocytes. Par ailleurs, le sort d'une cellule dépend de l'état d'équilibre entre les signaux de survie et les signaux de mort qu'elle reçoit, le signal le plus fort influençant son devenir. Le processus de mort cellulaire par apoptose est induit par deux différentes voies : la voie des récepteurs de mort et la voie de la mitochondrie. Ces deux voies convergent avec l'activation des caspases, protéases cellulaires responsables de l'apparition des changements morphologiques classiques lors de l'apoptose. Ces voies d'induction d'apoptose sont fortement influencées par l'activité de plusieurs voies de signalisation médiée par des protéines kinases et phosphatases. Des indications démontrent que certaines protéines kinases doivent être activées et d'autres inactivées afin de s'assurer du bon déroulement du programme apoptotique. Il a de plus été démontré que les voies d'activation des lymphocytes et les voies de signalisation régulant le processus d'apoptose sont intimement reliées.

Des études préliminaires effectuées dans notre laboratoire sur une banque de cellules d'origine lymphoïdes ont permis de cibler certains types de cellules sensibles à l'action du TBT. Il a également été déterminé que les tyrosine kinases et tyrosine phosphatases ont un rôle à jouer dans le processus de fragmentation de l'ADN lors de l'induction d'apoptose par le TBT. Dans cette perspective, les objectifs de ce projet de recherche étaient de déterminer si le CD45, une protéine tyrosine phosphatase transmembranaire essentielle à l'activation des lymphocytes B et T, possédait un rôle à jouer dans le processus d'induction d'apoptose induit par le TBT et de déterminer à quel niveau de la cascade d'événements biochimiques se déroulant au cours de l'apoptose le CD45 pourrait être impliqué. Les résultats obtenus au cours de ces travaux ont fait d'une publication scientifique qui est présenté dans la section 2 de ce mémoire.

## **SECTION 1**

### **REVUE DE LITTÉRATURE**

# CHAPITRE 1

## L'APOPTOSE

### 1.1 Introduction

Le processus de mort cellulaire programmée a été observé pour la première fois au 19<sup>e</sup> siècle lors de la métamorphose amphibienne par Vogt (1842). Ce processus a par la suite été mis en évidence au sein de plusieurs tissus en développement tant chez les vertébrés que chez les invertébrés (Glucksman, 1951). En 1972, Kerr, Wyllie et Currie ont proposé une classification des différents types de morts cellulaires observés à l'intérieur de l'organisme en deux grands groupes: la mort cellulaire par nécrose et la mort cellulaire par apoptose. Le processus par lequel meurent les cellules au centre de diverses lésions aiguës comme l'ischémie et les traumatismes fût appelé nécrose. Lors de ce phénomène, l'augmentation du volume des cellules et des organelles est suivie d'une rupture de la membrane plasmique, entraînant ainsi une libération du contenu cellulaire dans le milieu environnant qui conduit au déclenchement d'une réponse inflammatoire. Au contraire, la mort des cellules au cours du développement normal, lors de l'homéostasie tissulaire ou à la périphérie des lésions a été dénommée apoptose. Lors de ce type de mort cellulaire, les cellules vont plutôt avoir tendance à se condenser et à se rétracter sur elles-mêmes. De cette façon, les organelles et la membrane plasmique conservent leur intégrité et les cellules mortes sont rapidement phagocytées par les macrophages ou autres cellules environnantes, et ce avant tout relargage de matériel hors de la cellule.

Bien que soupçonné par Kerr et ses collègues, ce n'est que plusieurs années plus tard que la présence d'un programme de mort actif à l'intérieur de la cellule fût reconnue. Ce sont les études génétiques effectuées sur le nématode *Caenorhabditis elegans* qui ont permis d'obtenir une grande quantité d'informations sur la nature de la machinerie intracellulaire responsable du programme de mort cellulaire (O'Reilly et Strasser, 1999). Durant le développement normal, 131 des 1090 cellules générées chez cet organisme meurent par apoptose (Sulston *et al.*, 1983). Les gènes de mort de *Caenorhabditis elegans*

(CED) *Ced-3*, *Ced-4* et *egl-1* sont essentiels au processus de mort par apoptose alors que le gène *Ced-9* antagonise leur fonction et prévient la mort cellulaire (Ellis, Yuan et Horvitz, 1991; Hengartner et Horvitz, 1994). Le gène *Ced-9* est l'homologue de Bcl-2 chez les mammifères, dont l'action est de prévenir la mort cellulaire (Vaux, Weissman et Kim, 1992). Le premier homologue trouvé chez les mammifères pour le gène *Ced-3* est l'enzyme de conversion de l'interleukine-1 $\beta$  (ICE)<sup>11</sup>, responsable du clivage de la pro-interleukine-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) et qui possède une activité pro-apoptotique (Thornberry *et al.*, 1992; Miura *et al.*, 1993). D'autre part, l'homologue de *Ced-4* est le facteur d'activation de protéases apoptotiques-1 (APAF-1) alors que *Egl-1* est un membre pro-apoptotique de la famille du Bcl-2 (O'Reilly et Strasser, 1999). Globalement, ces travaux ont permis de déterminer que les homologues de *Ced-9* agissaient en amont de *Ced-3*, et que *Ced-4* agirait en tant que connecteur entre ces deux groupes de protéines, ce qui a servi de base à l'explosion ultérieure des découvertes concernant le mécanisme d'action de l'apoptose.

La mort cellulaire programmée ou apoptose est un mécanisme cellulaire qui a été conservé au cours de l'évolution. Elle joue un rôle important non seulement chez les mammifères, mais également chez les invertébrés, les insectes, les bactéries, les algues unicellulaires et chez les plantes (Jacobsen, Weil et Raff, 1997). L'apoptose est un mécanisme de suicide cellulaire impliqué dans l'élimination des cellules âgées, endommagées, non-nécessaires, dangereuses ou infectées. Elle est essentielle au modelage tissulaire durant le développement embryonnaire, à l'homéostasie cellulaire et la protection contre les pathogènes et agents toxiques (Kerr et Harmon, 1991; Cohen *et al.*, 1992, Vaux et Strasser, 1996). Une perturbation du processus normal d'apoptose est impliquée dans diverses conditions pathologiques telles que le cancer, les réactions d'auto-immunité, les dommages ischémiques, les infections virales et les maladies neurodégénératives comme l'alzheimer, le Parkinson et le syndrome de Huntington (Thompson, 1995; Nicholson, 1996). Morphologiquement, l'apoptose est caractérisée par la condensation et la fragmentation de la chromatine nucléaire, le clivage de l'acide

---

<sup>1</sup> Seule la traduction française des symboles et abréviations a été inscrite dans le texte. Le cas échéant, le lecteur retrouvera dans la liste des abréviations la définition anglaise originale de ces termes.

déoxyribonucléique (ADN) au niveau des jonctions internucléosomales qui génère des fragments multiples de 180-200 paires de bases (pb), une diminution du volume de la cellule, une compression des organelles, la formation de blebs au niveau de la membrane plasmique et une perte d'intégrité de la membrane provoquant la relocalisation des résidus phosphatidylsérine à l'extérieur de la cellule (Kerr et Harmon, 1991; Cohen *et al.*, 1992). Plusieurs stimuli peuvent induire l'apoptose, soit la liaison des récepteurs de la famille du facteur de nécrose tumorale (TNF), l'absence de sérum ou de molécules d'adhésion extracellulaires, un choc osmotique, la perte d'intégrité des microtubules, l'irradiation, les agents chimiothérapeutiques ou les agents toxiques.

### **1.1.1 Élimination des cellules apoptotiques**

L'élimination d'une cellule ayant entrepris son programme d'apoptose peut se faire en moins d'une heure à l'intérieur de l'organisme. Il s'agit donc d'un processus très rapide et même en situation de mort cellulaire programmée à large échelle, très peu de cellules mortes sont détectables (Jacobsen, Weil et Raff, 1997). L'apoptose est décrite comme une forme de mort silencieuse dont les évidences physiques sont nettoyées par les cellules phagocytaires (Green et Beere, 2000). La reconnaissance et l'élimination d'une cellule apoptotique par le macrophage est médié par un changement d'expression de certains marqueurs au niveau de la membrane de la cellule apoptotique qui vont sélectivement interagir avec des récepteurs spécifiques à la surface du phagocyte (Green et Beere, 2000). L'un de ces changements est l'exposition des résidus lipidiques phosphatidylsérine à l'extérieur de la membrane plasmique permettant leur capture par les cellules phagocytaires (Fadok *et al.*, 1992). Très récemment, le récepteur des phosphatidylsérine à la surface des macrophages humains activés qui permet la phagocytose sélective phosphatidylsérine-dépendante des cellules apoptotiques a été découvert (Fadok *et al.*, 2000). La liaison de ce récepteur stimule entre autres la libération de cytokines anti-inflammatoire comme le facteur de croissance transformateur- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoire comme le TNF- $\alpha$ , faisant ainsi un lien avec les conséquences physiologiques de la mort par apoptose.

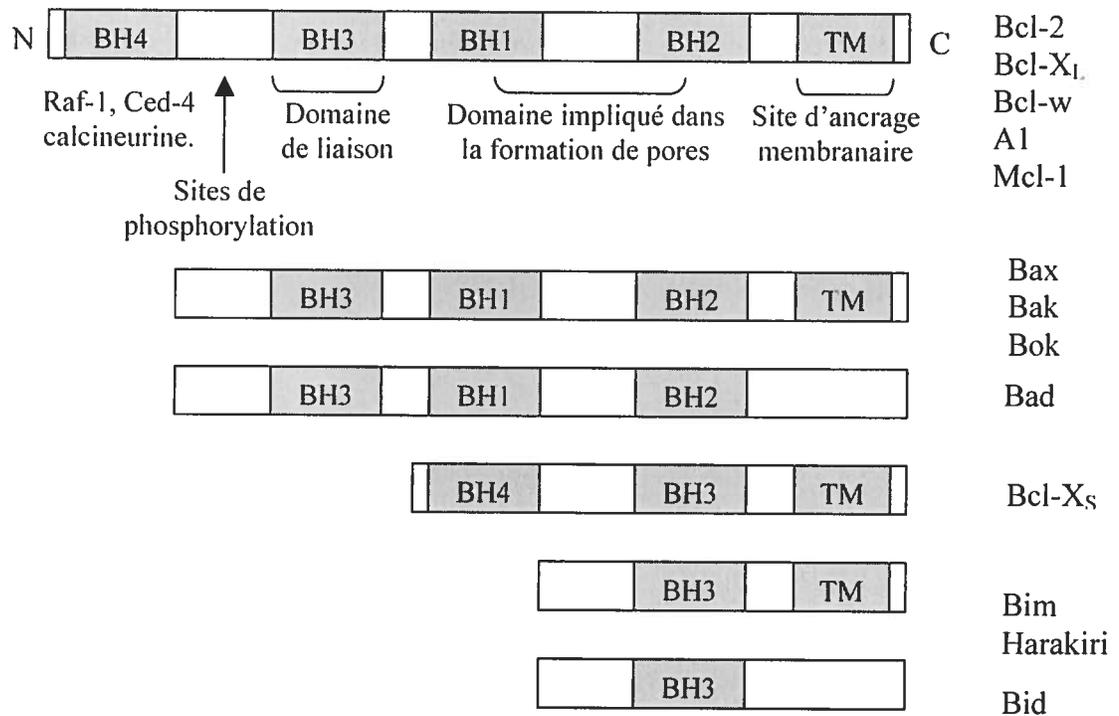
## **1.2 Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose**

Le processus d'induction de l'apoptose comprend généralement 4 phases: l'initiation, la décision, l'exécution et la destruction. La mitochondrie est considérée comme étant le centre décisionnel du processus apoptotique et la préservation de son intégrité membranaire est extrêmement importante à ce sujet. La mitochondrie est composée de deux compartiments bien définis, soit la matrice qui est entourée par la membrane interne, et l'espace intermembranaire qui est entouré de la membrane externe. La membrane interne, structurellement formée d'une suite de crêtes qui augmentent sa surface, contient les protéines formant la chaîne de transport d'électrons, l'adénosine triphosphate synthase (ATP synthase) et le translocateur à nucléotide adénine (ANT). En conditions physiologiques, la membrane interne est imperméable et ceci permet d'établir un gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane ( $\Delta\psi_m$ ) essentiel à la génération d'ATP par l'ATP synthase. L'ATP formé est exporté par l'ANT en échange d'adénosine diphosphate (ADP). Le canal ionique voltage-dépendant (VDAC) est la protéine la plus exprimée au sein de la membrane externe et en conditions normales est perméable à des molécules ayant jusqu'à 5000 Daltons (Da). Lorsqu'il y a induction d'apoptose, la membrane externe devient perméable ce qui entraîne la libération dans le cytoplasme de molécules qui sont normalement confinés dans l'espace intermembranaire comme le cytochrome c, l'adénylate cyclase 2 et le facteur d'induction de l'apoptose (AIF). De son côté, la perméabilisation de la membrane interne entraîne le passage de molécules ayant jusqu'à 1500 Da, la libération de petites molécules comme le calcium et le glutathion, la dissipation du potentiel transmembranaire et un influx d'eau, ce dernier provoquant le gonflement de la matrice (Kroemer et Reed, 2000).

### **1.2.1 Régulation par les membres de la famille de Bcl-2**

Les protéines de la famille de Bcl-2 jouent un rôle important dans la régulation de la perméabilité membranaire de la mitochondrie suite à l'induction de mort cellulaire. Le proto-oncogène Bcl-2 a été le premier régulateur de la mort cellulaire identifié à la suite de son clonage de la région chromosomale transloquée t(14:18) chez un lymphome de cellules B (Kroemer, 1997). Son rôle a été découvert lorsqu'il a été démontré que la surexpression de Bcl-2 pouvait inhiber l'apoptose induite par la privation de facteur de

croissance. Par la suite, la génération de souris transgéniques a permis de déterminer que cette protection s'appliquait également contre une vaste gamme de stimuli physiologiques et cytotoxiques, suggérant que plusieurs voies de signalisation indépendantes convergent à une machinerie de mort cellulaire commune au centre de laquelle se trouve Bcl-2 (O'Reilly et Strasser, 1999). Plusieurs autres molécules apparentées au Bcl-2 sont connues à ce jour et elles sont divisées en protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques. Chez les mammifères, la famille des protéines anti-apoptotiques homologues de Bcl-2 inclue Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, A1 et Mcl-1 alors que les membres pro-apoptotiques sont les protéines Bax, Bcl-X<sub>S</sub>, Bak, Bad, Bid, Bik/Nbk, Bok/Mtd, Harakiri/DP5, Blk, et Bim. Tous ces membres possèdent un certain nombre de régions homologues à Bcl-2 (BH) qui détermine leur capacité à interagir les uns entre les autres ou avec d'autres protéines non-associées (Figure 1).



**Figure 1 : Relation structure-fonction des protéines membres de la famille de Bcl-2**

(Modifié de Kroemer, 1997 et Reed, 1997)

Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> possèdent les quatre domaines BH qui sont tous requis pour la protection contre la mort cellulaire. Par contre, le groupe des molécules pro-apoptotiques est divisé en deux catégories: ceux dont Bad, Bax, Bak et Bok qui possèdent les domaines BH1 à BH3, et ceux dont Bid, Bik, Blk, Harakiri et Bim, qui ne possèdent que le court domaine BH3. La présence d'un domaine transmembranaire (TM) permet à certains membres d'être ancrés au niveau des membranes intracellulaires ce qui influence leur distribution cellulaire (Kroemer, 1997). La plupart des protéines de la famille de Bcl-2 sont localisées au niveau de la membrane externe de la mitochondrie mais il a été déterminé que Bcl-2, en plus d'être présente en grande quantité aux endroits de jonctions entre la membrane interne et externe sur la mitochondrie, pouvait également être localisée au niveau de la membrane nucléaire et du réticulum endoplasmique (Kroemer, 1997). L'étude cristallographique de la protéine Bcl-x<sub>L</sub> a démontré que celle-ci possède une région (comprenant le domaine BH1 et une partie du domaine BH2) de grande similarité avec les domaines impliqués dans la formation de pores de certaines toxines bactériennes (Muchmore *et al.*, 1996). Ceci suggère que les membres de la famille de Bcl-2 agiraient au niveau de la mitochondrie en s'insérant dans la membrane et entraîneraient la formation de canaux (Reed, 1997). Les protéines du premier groupe des molécules pro-apoptotiques dont Bax et Bak ont une forte homologie avec Bcl-x<sub>L</sub> et auraient également la capacité de former des canaux. Bax et Bak, qui sont retrouvés aussi attachés faiblement à la membrane mitochondriale externe, peuvent subir lors de l'induction d'apoptose un changement conformationnel et s'insérer complètement dans la membrane externe. Ils participeraient de cette façon à la formation de canaux, à la perméabilisation des membranes mitochondriales et à la libération des facteurs impliqués dans l'activation des protéases apoptotiques (Goping *et al.*, 1998; Griffiths *et al.*, 1999).

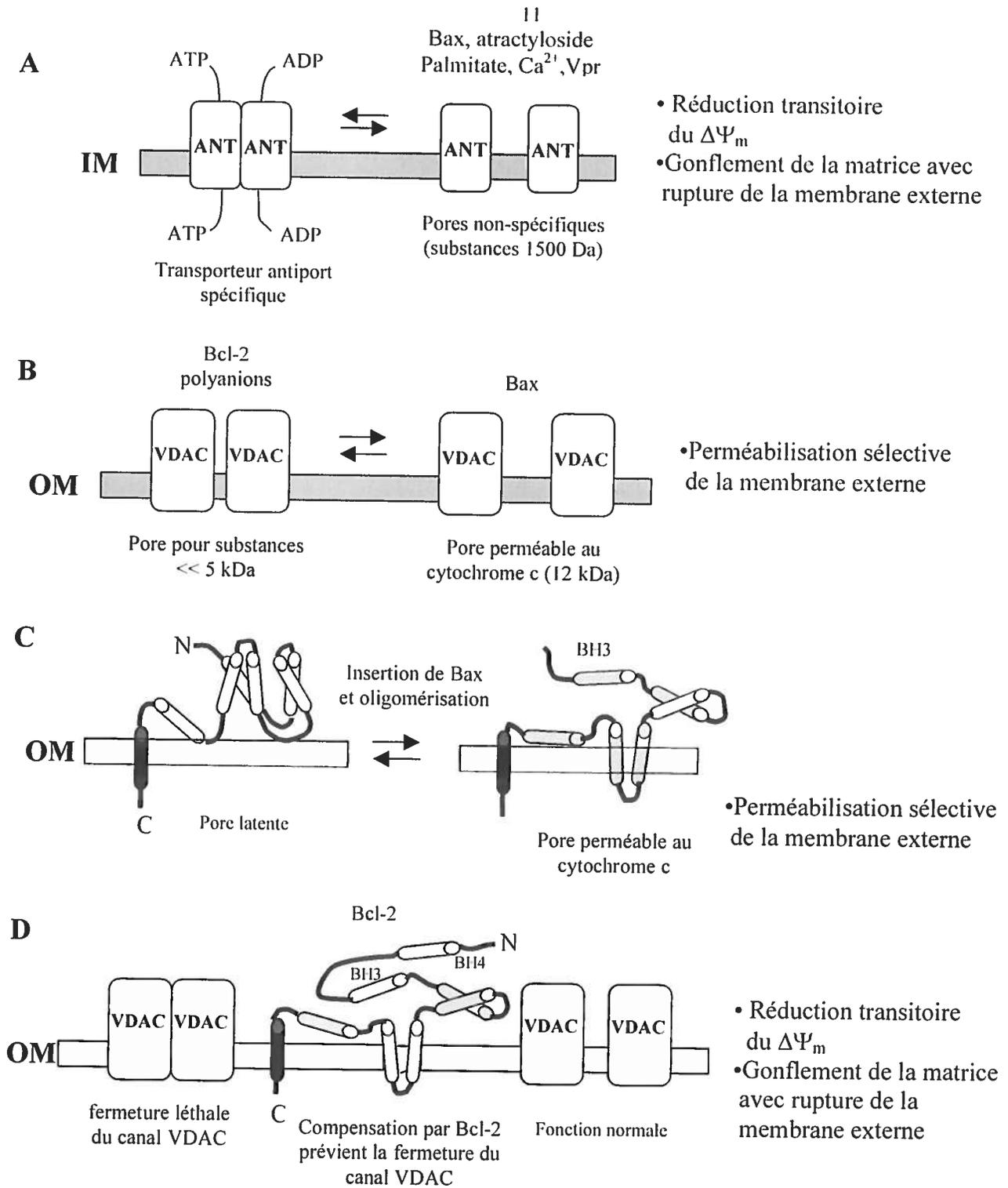
Lorsque localisé dans le cytoplasme, Bax se présente sous la forme d'un monomère. Il a été démontré que ce dernier était transloqué au niveau des membranes mitochondriales où il a la capacité de former des dimères et des oligomères lors de conditions apoptotiques (Kroemer et Reed, 2000). Ceci témoigne d'un second mode d'action des protéines pro-apoptotiques dans lequel le domaine BH3 est important. En effet, ce domaine a pour rôle de permettre aux molécules pro-apoptotiques d'interagir

avec le domaine correspondant sur Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> et d'inhiber leur activité protectrice. Le domaine BH3 a également pour propriété de permettre à ces molécules de former des homodimères et des oligomères qui facilitent leur translocation au niveau de la mitochondrie (Conus *et al.*, 2000; Kelekar *et al.*, 1998). Bim par exemple, qui est normalement séquestré dans les microtubules par son interaction avec la chaîne légère dynéine, est transloqué à la mitochondrie après induction d'apoptose (Bouillet *et al.*, 1999). Il a été proposé à la suite de l'inactivation du gène de Bim que chez les cellules hématopoïétiques, celui-ci serait le principal effecteur de plusieurs signaux pro-apoptotiques au niveau de la mitochondrie (Bouillet *et al.*, 1999).

Par ailleurs, il y a d'autres types d'événements peuvent influencer la distribution cellulaire des protéines de la famille de Bcl-2. Par exemple, la localisation de Bad, qui ne possède pas de domaine TM, est régulée par des événements de phosphorylation. Seule la forme non-phosphorylée (médiée par la calcineurine) est localisée au niveau de la mitochondrie où elle peut interagir avec Bcl-2 ou Bcl-X<sub>L</sub>. La phosphorylation de Bad est causée par les kinases Akt/PKB et Raf-1, ce qui entraîne sa redistribution dans le cytoplasme où il s'associe avec la protéine 14-3-3 (Harada *et al.*, 1999; Kroemer et Reed, 2000). De son côté, Bid est transloqué du cytoplasme à la mitochondrie suite à son clivage par la caspase-8. Parmi d'autres mécanismes susceptibles d'induire une perturbation du potentiel mitochondrial, il y a le clivage et la conversion de Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> en des formes pro-apoptotiques par les caspases 1 et 3, et la phosphorylation de Bcl-2 et de Bcl-X<sub>L</sub> résultant en leur inactivation (Kroemer et Reed, 2000). À cet égard, l'action des agents chimiothérapeutiques tels que le taxol, le vinblastine et le vincristine sur les microtubules et l'action d'agents génotoxiques peuvent provoquer une phosphorylation de Bcl-2 qui est impliqué dans leur mécanisme d'induction d'apoptose (Kroemer, 1997).

### **1.2.2 Transition du potentiel mitochondrial**

Le mécanisme par lequel il y a transition du potentiel mitochondrial au cours du processus d'apoptose n'a pas été encore clairement défini. À partir des études publiées dans la littérature, Kroemer et Reed (2000) proposent 4 mécanismes par lesquels pourrait être induite une perturbation du potentiel membranaire mitochondrial (Figure 2). Dans le



**Figure 2** : Mécanismes possibles pour la perméabilisation de la membrane interne (IM) ou de la membrane externe (OM) lors de l'induction d'apoptose

(Modifié de Kroemer et Reed, 2000)

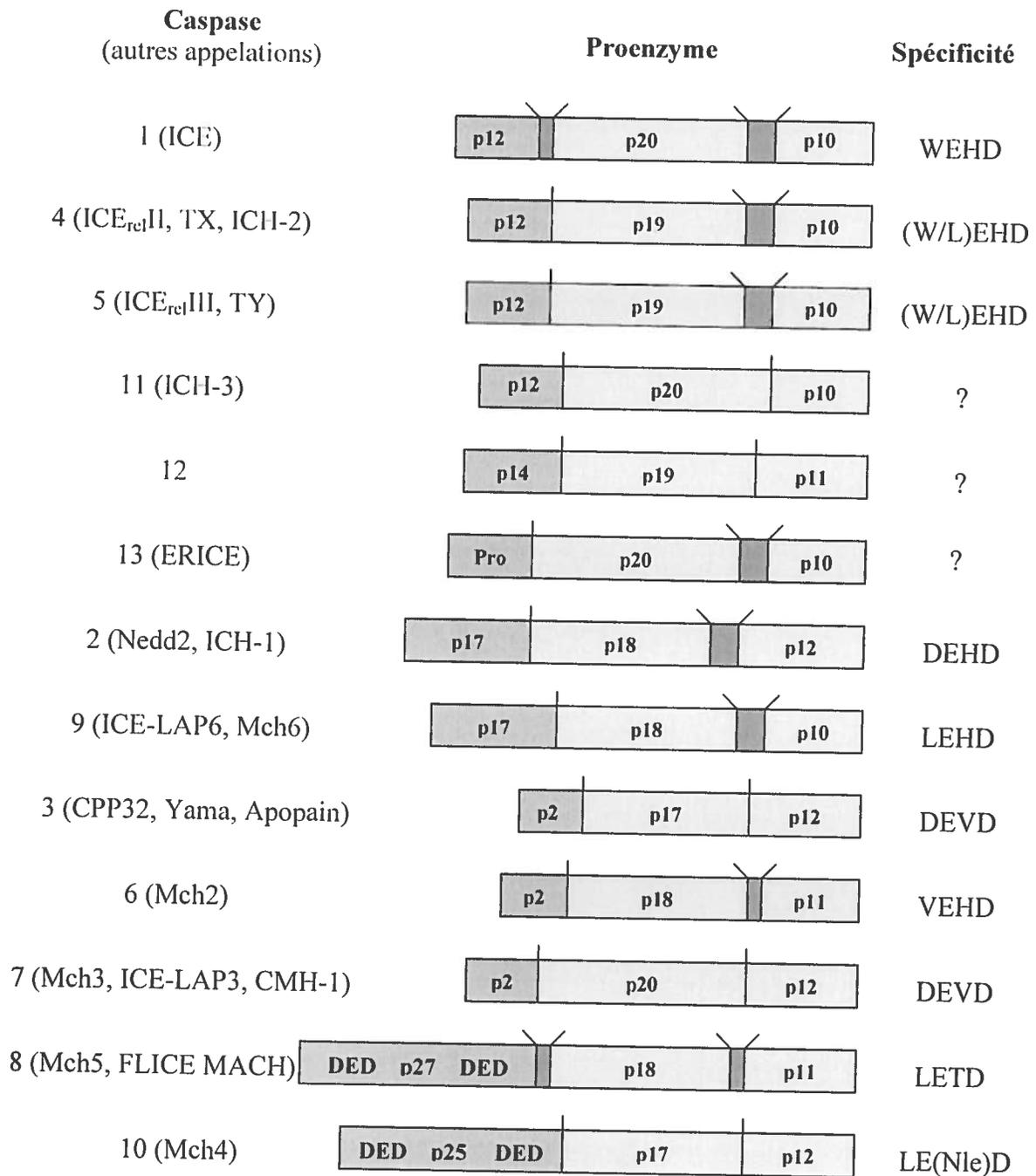
premier modèle (A), la formation de pores au niveau du translocateur ANT est responsable de la perméabilisation de la membrane interne, le gonflement de la matrice et la rupture subséquente de la membrane externe. Des molécules telles que Bax, le calcium, le palmitate et certaines protéines virales (Vpr) sont reconnues pour interagir spécifiquement avec ANT afin de former des pores non-spécifiques. Dans le deuxième modèle (B), le canal VDAC est responsable d'une perméabilisation primaire de la membrane externe sans toutefois affecter la membrane interne via son interaction avec les membres de la famille de Bcl-2. La perméabilisation de VDAC au cytochrome c est favorisé par l'action de Bax et inhibé par le Bcl-2. Dans le troisième modèle (C), Bax agit indépendamment afin de former un canal perméable au niveau de la membrane externe, une activité qui serait favorisée par Bid. Dans le quatrième modèle (D), une augmentation du  $\Delta\Psi_m$  au niveau de la membrane interne en conditions apoptotiques implique un transfert de charges à la membrane externe, causant la fermeture de VDAC qui se ferme lorsque le voltage augmente. Bcl-2 agirait dans ce modèle en permettant le passage d'ions et dissipant le potentiel électrique au niveau de la membrane externe. Il permettrait de cette façon les échanges d'ATP et d'ADP par VDAC et ANT et empêcherait l'augmentation de volume de la matrice.

Enfin, l'interaction de Bcl-2 avec la membrane mitochondriale caractérisée par la formation de canaux ioniques n'est pas la seule fonction qu'on lui attribue. En effet, bien que Bcl-2 soit normalement ancrée au niveau des membranes intracellulaires, elle possède dans sa portion orientée vers le cytoplasme, une face hydrophobique (correspondant structurellement au domaine BH4) qui agit comme adaptateur ou recruteur pour plusieurs protéines (Reed, 1997). Parmi les protéines impliquées, il y a des activateurs de caspases dont CED-4, certaines protéines kinases comme Raf-1, des protéines phosphatases comme la calcineurine, des GTPases telles que R-Ras et H-Ras et des régulateurs de facteurs de transcription comme  $\kappa$ -B $\alpha$ . Le but de ces interactions serait de déplacer certaines protéines hors du cytoplasme, soit en les séquestrant à certains sites membranaires spécifiques et les inactiver ou en servant d'adaptateur à ces protéines afin qu'elles puissent interagir avec d'autres protéines membranaires (Reed, 1997).

### **1.3 Les caspases: protéases exécutrices de l'apoptose**

La famille des caspases, abréviation de cystéine aspartases, compte 13 membres chez les mammifères dont 11 ont été identifiées chez l'humain et 2 chez la souris (caspases 11 et 12) (Voir Figure 3). Ces enzymes sont essentielles au processus de mort cellulaire programmée et leur activité peut être détectée chez toutes les cellules ayant entrepris leur programme de suicide. Elles sont synthétisées en tant que précurseurs, appelés zymogènes, qui ne possèdent qu'une très faible activité enzymatique. Structuellement, la forme du précurseur comprend un pro-domaine à l'extrémité N-terminale suivi des séquences encodant la grande et la petite sous-unité des caspases. Pour être pleinement actives, les caspases doivent subir au minimum deux clivages internes à l'extrémité C-terminale de résidus aspartate afin d'exciser le prodomaine, les peptides intervenants et de séparer la grande et la petite sous-unité. Ces clivages se produisent selon un ordre établi, le clivage entre les sous-unités précédant celui enlevant le prodomaine. Chacune des caspases actives dérive de l'association de deux procaspases ayant subi les clivages internes. Cela entraîne la formation d'une enzyme tétramérique, aussi décrite comme un homodimère d'hétérodimère, qui contient deux sites actifs. Des études ont démontré que les deux sous-unités seraient impliqués dans la formation du site actif, qui correspondrait à un motif général glutamine-alanine-cystéine-X-glycine (QACXG) où X= arginine (R), Q ou G. Les caspases reconnaissent des séquences peptidiques spécifiques de 4 acides aminés, et clivent leur substrat en hydrolysant le lien peptidique situé sur le côté C-terminal d'un résidu aspartate situé en position 1 (P1). Le résidu P1 est essentiel à l'action des caspases, alors que le résidu P4, situé trois positions plus loin du côté amino-terminal serait responsable de la spécificité des caspases. Les résidus P2 et P3 du site enzymatique n'ont qu'un effet limité sur le clivage car leur chaîne principale pointe à l'opposé de l'enzyme. La structure générale des procaspases, les sites de clivage interne et le substrat correspondant à leur activité optimale sont présentés dans la figure 3.

Les caspases peuvent être classées en deux groupes: les caspases initiatrices et les caspases exécutrices. Les caspases possédant un long prodomaine (caspase-2, -8, -9, -10) sont impliquées dans l'initiation des réponses apoptotiques et sont appelées caspases



**Figure 3** : Structure des procaspases et sites de clivages internes.

(Modifié de Denis *et al.*, 1998; O'Reilly et Strasser, 1999)

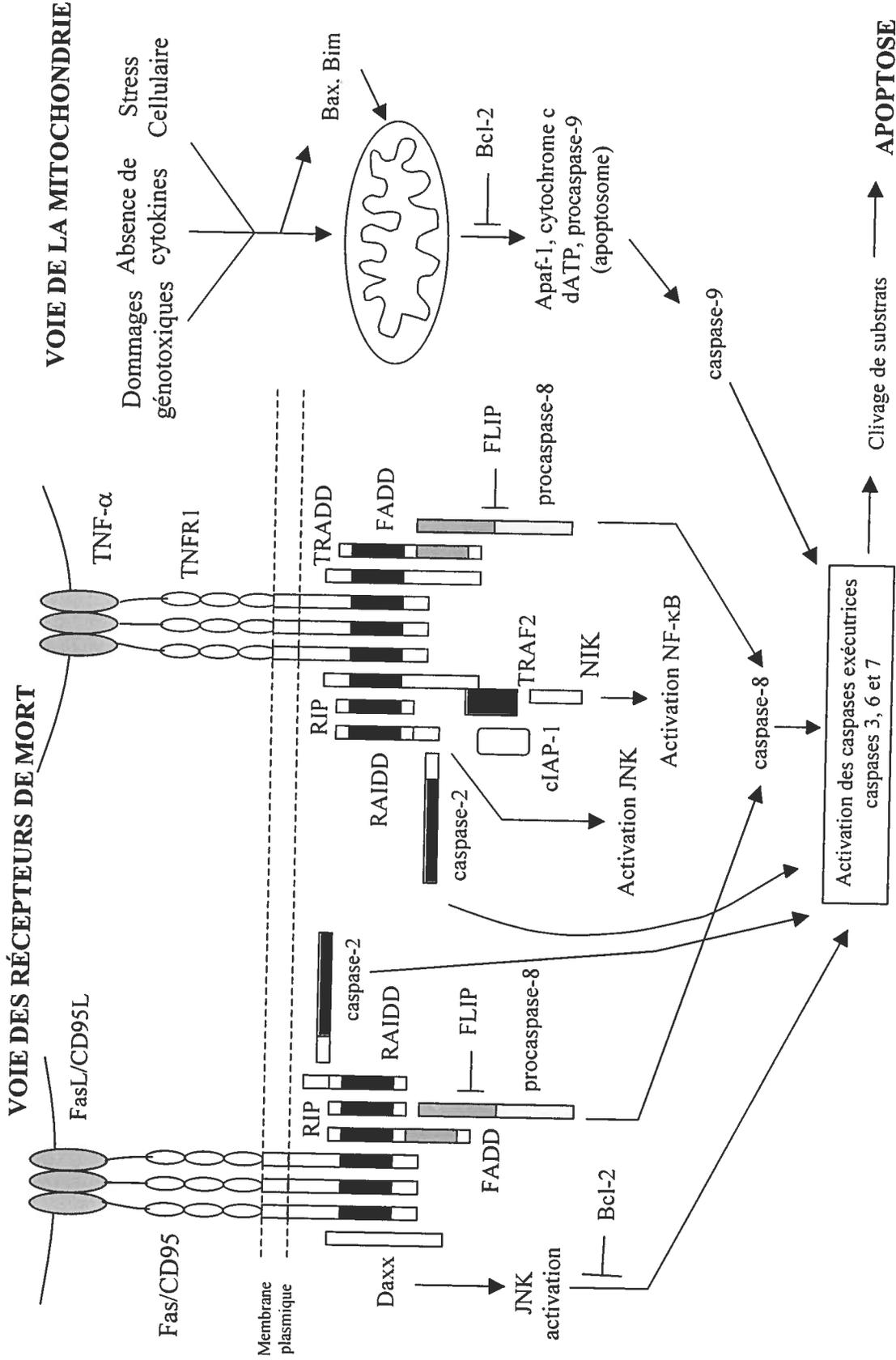
initiatrices et les caspases ayant un court prodomaine (caspase-3, -6 et -7) sont activées par les caspases initiatrices et sont nommées caspases exécutrices. Ces dernières ont pour rôle de cliver plusieurs substrats à l'intérieur de la cellule afin de permettre la destruction de celle-ci. D'autre part, alors qu'un rôle dans l'induction d'apoptose avait été initialement suggéré pour les caspases de la famille ICE (caspases 1, 2, 4, 5 et 11), maintenant elles sont plutôt reconnues pour leur rôle dans la régulation de l'inflammation par le clivage des cytokines IL-1 $\beta$  et interféron- $\gamma$ . (Cohen, 1997; Denis *et al.*, 1998; Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999).

### **1.3.1 Activation des caspases**

L'activation des caspases peut se faire de deux façons: la première se produit suite à l'action d'une autre protéase, la plupart du temps une caspase, et la deuxième suite à l'action d'une protéine adaptatrice qui se lie au prodomaine des caspases initiatrices. Cette dernière interaction promouvoit l'activation des caspases initiatrices qui vont ensuite cliver et activer les caspases exécutrices (Green, 2000). La convergence entre l'arrivée des signaux apoptotiques et l'activation des caspases initiatrices menant au processus de dégradation finale de la cellule se fait via deux voies principales, la voie de la mitochondrie et la voie des récepteurs de mort (DR) (Voir Figure 4).

#### **1.3.1.1 Voie de la mitochondrie**

L'activation des caspases via la libération de facteurs mitochondriaux est la voie majeure employée par les médicaments anti-néoplasiques, les dommages génotoxiques et les agents toxiques. Comme il a été mentionné dans la section précédente, la transition du potentiel mitochondrial est accompagnée de la formation de pores qui permettent le passage sélectif de certaines molécules, dont le cytochrome c. Il a été récemment démontré que la libération du cytochrome c dans le cytoplasme était rapide, totale et suivait une cinétique invariable, démontrant qu'une fois le processus de perméabilisation enclenché, l'expulsion se poursuit jusqu'à libération complète de la protéine (Martinou, Desagher et Antonsson, 2000; Goldstein *et al.*, 2000). Dans le cytoplasme, le cytochrome c va se lier à la protéine APAF-1, et en présence de dATP ou de d'ATP APAF-1 va subir



**Figure 4 :** Différentes voies de signalisation apoptotique convergent à l'activation des caspases exécutrices

(Modifié de O'Reilly et Strasser, 1999)

un changement de conformation qui permet son interaction avec la procaspase-9 (Zou *et al.*, 1997). La molécule APAF-1 et la procaspase interagissent et oligomérisent via leur domaine de recrutement des caspases (CARD) situé dans la position N-terminale des deux protéines, ce qui entraîne l'autoactivation de la procaspase-9 (Li *et al.*, 1997). La caspase 9 initiateur a ensuite pour rôle d'activer les caspases exécutrices 3, 6 et 7. Une boucle d'activation positive irréversible, amplifiant le signal émis, est ainsi enclenchée parce qu'il a été également déterminé que la caspase-9 est un substrat de la caspase-3 (Srinivasula *et al.*, 1996). La présence d'ATP étant essentielle au recrutement de la caspase-9 par la molécule APAF-1, lors de conditions où les niveaux d'ATP sont réduits cette voie d'activation des caspases est inhibée. Les changements morphologiques caspase-dépendants tels que la fragmentation internucléosomale de l'ADN et la condensation de la chromatine sont absents et le mode de mort cellulaire devient nécrotique. La capacité de générer de l'ATP par la mitochondrie suite à la perméabilisation des membranes mitochondriales déterminerait donc s'il y a activation des caspases, résultant en l'induction d'apoptose, où s'il y a une catastrophe bioénergétique au cours de laquelle il n'y a pas activation des caspases et résultant en arrêt d'apoptose ou en nécrose (Kroemer et Reed, 2000).

### **1.3.1.2 Voie des Récepteurs de Mort**

Les récepteurs de mort font partie de la famille du récepteur de TNF (TNFR) et les membres principaux sont Fas, TNFR1, et les récepteurs de mort DR3, DR4, DR5. Le récepteur Fas a été le premier à être identifié à l'aide d'anticorps induisant rapidement l'apoptose chez des cellules cibles (Trauth *et al.*, 1989). Ces récepteurs possèdent, dans leur portion extracellulaire, des motifs conservés riches en cystéine qui sont essentiels pour la liaison de leur ligand (Smith, Farrah et Goodwin, 1994). De plus, ces récepteurs sont composés d'une queue intracytoplasmique comprenant une région d'homologie de 80 acides aminés, essentielle pour la transmission du signal apoptotique qui a été nommée domaine de mort (DM) (Itoh et Nagata, 1993; Tartaglia *et al.*, 1993). Les ligands de ces récepteurs sont membres des protéines trimériques transmembranaires de type II de la famille du TNF, sont exprimés à la surface de la cellule et peuvent être libérés de la surface par des métalloprotéinases (Siegel *et al.*, 2000). Les associations ligands-

récepteurs sont les suivantes: Fas-FasL, TNF-TNFR1, DR3-APO3-L, DR4-TRAIL et DR5-TRAIL (où FasL = ligand de Fas et TRAIL = Ligand homologue à TNF $\alpha$  inducteur d'apoptose). La voie de signalisation la plus connue est celle médiée par Fas qui a une grande importance dans la surveillance et l'homéostasie immunitaire. La liaison par FasL induit la trimérisation du récepteur, ce qui facilite l'interaction homotypique entre les domaines de mort du récepteur et ceux d'une protéine adaptatrice associée à Fas avec un domaine de mort (FADD) (Chinnaiyan *et al.*, 1995). L'agrégation de ces molécules au récepteur Fas activé forme un complexe de signalisation inducteur de mort (DISC) (Kischkel *et al.*, 1995). La région N-terminale de FADD comporte un domaine exécuteur de mort (DED) qui permet le recrutement de la procaspase-8 au DISC via son interaction avec le DED correspondant de cette dernière. Le recrutement de la caspase-8 induit son autocatalyse et la libération de la forme active dans le cytoplasme (Medema *et al.*, 1997).

Les autres récepteurs de mort agissent sensiblement de la même façon en ce qui concerne l'activation des caspases initiatrices. Le récepteur TNFR1 se lie à une autre molécule adaptatrice nommée protéine homologue associée à TNF avec un domaine de mort (TRADD) qui, ne possédant pas de DED, s'associe avec FADD afin de procéder au recrutement de la caspase-8 (Hsu, Xiong et Goeddel, 1995). D'autre part, TRADD peut interagir avec la protéine d'interaction avec les récepteurs (RIP), une protéine sérine/thréonine kinase qui se lie avec le DM localisé dans la portion C-terminale de la protéine homologue à ICH-1/CED-3 associée à RIP avec un domaine de mort (RAIDD), permettant à celle-ci de recruter et d'activer la caspase-2 (Duan et Dixit, 1997). Cependant, le rôle principal de RIP serait de relier la voie du TNF à l'activation du facteur de transcription nucléaire- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), donc un rôle antiapoptotique (Siegel *et al.*, 2000). Par ailleurs, la caspase-10 peut être également activée suite à la liaison de TNFR1, DR3, DR4 et DR5. Enfin, d'autres protéines ont été reconnues comme interagissant avec la portion intracellulaire de Fas, soit Daxx, qui induirait l'apoptose via jun kinase (JNK), FAP, une tyrosine phosphatase ayant un effet inhibiteur sur la voie de signalisation de Fas, et les protéines FAF-1, UBC/FAP et Sentrin, du complexe ubiquitine-protéasome dont le rôle reste encore à définir (Siegel *et al.*, 2000).

Deux voies de signalisation différentes mènent à l'activation des caspases exécutrices suite à l'activation de la caspase-8. Dans les cellules de type I, l'activation de la caspase-8 suite à son recrutement au niveau du DISC induit une activation directe des caspases exécutrices. Les thymocytes et les lymphocytes du sang périphérique entrent dans ce groupe de cellules. D'autre part, les cellules de type II (ex. hépatocytes) ont besoin d'un signal amplificateur originant de la mitochondrie afin de procéder à l'activation des caspases exécutrices (Scaffidi *et al.*, 1998). Des études subséquentes ont confirmé que la caspase-3 était un substrat majeur de la caspase-8 et que l'action de la caspase-8 au niveau de la mitochondrie se ferait via le clivage de Bid, un membre proapoptotique de la famille de Bcl-2 qui favorise l'oligomérisation de Bax et la libération de cytochrome c (Stennicke *et al.*, 1998; Bossy-Wetzel et Green, 1999). Un des facteurs qui influencerait par quelle voie le signal est transmis serait la quantité de DISC formé au niveau de la membrane. Les cellules produisant rapidement de grandes quantités de caspase-8 actives n'ont pas besoin d'un cycle d'amplification et sont insensibles aux effets protecteurs des membres de la famille de Bcl-2, alors que les cellules où peu de caspase-8 actives sont formées sont dépendantes de la voie de la mitochondrie (Scaffidi *et al.*, 1998).

### **1.3.2 Régulation de l'activité des caspases**

Il a été mentionné plus tôt que l'activation des caspases pouvait être régulée par les membres de la famille de Bcl-2 au niveau de la mitochondrie. Elle peut également être modulée par l'interaction des caspases avec les protéines inhibitrices d'apoptose (IAP). Originellement clonées à partir de baculovirus, cinq homologues de la protéine IAP ont été identifiées chez les mammifères: cIAP-1, cIAP-2, XIAP, NAIP et survivin (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999). Ces protéines possèdent tous un domaine N-terminal contenant de multiples copies du motif IAP baculoviral (BIR) et sauf la survivin, une portion C-terminale formée d'un domaine ayant des protéines contenant du zinc médiant des interactions protéines-protéines (domaine RING) (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999). Les IAP peuvent se lier directement et inhiber certaines caspases dont les caspases 3, 6, 7 et 9. La liaison avec les caspases se fait via le motif BIR qui est nécessaire pour la fonction inhibitrice des IAP. De plus, il a été démontré que le domaine RING agit comme

une ubiquitine ligase et promouvoit la dégradation de la protéine XIAP par exemple et possiblement de la caspase à laquelle il est lié (Yang *et al.*, 2000). Les protéines cIAP-1, cIAP-2 et XIAP sont des transcrits induits par NF- $\kappa$ B et contribueraient à la protection des cellules lors de l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999). Très récemment, une autre protéine régulatrice a été découverte. Il s'agit de Smac/DIABLO, une protéine qui est relarguée de la mitochondrie en même temps que le cytochrome c durant l'apoptose (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000). Cette protéine favorise l'activation de la caspase-9 en se liant directement aux homologues de IAP et en libérant la caspase-9 de l'inhibition médié par ces dernières. L'état d'équilibre entre interactions constituerait donc un autre niveau décisionnel déterminant si la cellule se dirige vers un processus de survie ou de mort cellulaire.

Par ailleurs, un autre mécanisme de régulation des caspases implique des événements de phosphorylation. Il a été démontré que les caspases sont phosphorylées *in vivo* et que l'état de phosphorylation sur ces protéines régulerait leur activité sur des substrats potentiels (Martins *et al.*, 1998). Tel que décrit dans cette étude, la déphosphorylation des caspases est accompagnée d'une augmentation significative du clivage de la polymérase poly(ADP-ribose) (PARP), le tout premier substrat de la caspase-3 identifié (Martins *et al.*, 1998). D'autre part, il a été déterminé que la procaspase-9 était phosphorylée par la sérine/thréonine kinase Akt, et que cette phosphorylation inhibait son activité (Cardone *et al.*, 1998). Une relation peut aussi être établie entre l'état de phosphorylation sur des substrats des caspases et leur cinétique de clivage par celles-ci. Le clivage de la sous-unité I $\kappa$ B- $\alpha$  par la caspase-3 est bloquée par la phosphorylation de cette protéine sur un résidu sérine (Barkett *et al.*, 1997). De plus, il a été démontré que la phosphorylation de la protéine kinase MAPK/ERK kinase kinase-1 (MEKK-1) et PITSLRE précède leur clivage par les caspases après induction de l'apoptose (Widmann *et al.*, 1998; Tang, *et al.*, 1998). L'état de phosphorylation des caspases et de certains de ses substrats semblerait ainsi être un autre niveau de régulation où le combat entre les signaux de vie et de mort décide du sort de la cellule.

### 1.3.3 Substrats clivés par les caspases

Le rôle des caspases exécutrices dans le programme apoptotique est bloquer des voies de signalisation protectrices et de promouvoir des voies menant à la destruction cellulaire. Les caspases sont des enzymes dotées d'une grande sélectivité et clivent des protéines ayant une importance dans le maintien de l'intégrité du noyau, la progression du cycle cellulaire, la structure de la cellule, la fragmentation de l'ADN et la signalisation cellulaire. Plus de 40 substrats des caspases ont été identifiés, de ceux-ci 28 se sont révélés des substrats directs de la caspase-3, la principale caspase exécutrice. Les clivages ont pour conséquences d'inactiver des protéines qui favorise la survie de la cellule et de convertir des protéines bénignes en leur forme proapoptotique. Plusieurs protéines cytoplasmiques sont des substrats des caspases. On note certaines composantes du cytosquelette (actine, gelsoline, gas2,  $\alpha$ -fodrine), des composantes des jonctions adhérentes ( $\beta$ -caténine et plakoglobine), et des membres de la famille de Bcl-2 (Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-2, Bid et Bax). Dans le noyau, les protéines de structure lamine A et lamine B et NuMA sont clivées, de même que le récepteur de la lamine B, le composant de 70kDa de la petite ribonucléoprotéine U1 (U1-70), Mdm2 l'oncoprotéine associée à p53 et la protéine facteur de fragmentation de l'ADN de 45 kDa/inhibiteur de la DNase activée par les caspases (DFF45/ICAD), l'inhibiteur de l'endonucléase DFF40/CAD. Les protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN PARP, la sous-unité catalytique de DNA-PKc, RAD51, la grande sous-unité du facteur de réplication C, MCM3, la topoisomérase I et II et l'ARN polymérase I sont également des substrats des caspases. De plus, un grand nombre de protéines kinases sont clivées dont la protéine kinase C (PKC)  $\beta$ 1, PKC $\delta$ , PKC $\theta$ , PKN, la p21-activated kinase 2, PITSLRE, MEKK-1, Raf-1 et Akt-1. Plusieurs autre protéines impliquées dans la transduction de signaux sont aussi des substrats des caspases, soit les cytokines proinflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-16, IL-18, un modulateur de réponses kinases RasGAP, les adaptateurs Cbl et Cbl-b, la sous-unité régulatrice A $\alpha$  de la protéine phosphatase 2A (PP2A), la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), STAT1, le domaine Rel A de NF- $\kappa$ B et son régulateur I $\kappa$ B- $\alpha$  (Denis *et al.*, 1998; Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999).

Des protéines kinases encourageant l'apoptose sont activées par les caspases, des composantes du cytosquelette perdent leur intégrité ce qui affecte les voies de prolifération cellulaire qui y sont associées, les mécanismes de détection et de réparation de dommages génomiques sont inhibés et le noyau est démantelé. Parmi tous les substrats clivés par les caspases, il n'est pas impossible que plusieurs ne soient pas essentiels au déroulement de l'apoptose, certaines protéines pouvant être clivées par hasard. Néanmoins, la logique derrière tous ces clivages est d'interrompre les voies de prolifération et de survie et de s'assurer que la cellule va mourir.

#### **1.4 Dégradation nucléaire lors de la mort cellulaire**

La condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN sont des événements classiques induits lors de la mort cellulaire programmée. Au cours du processus d'apoptose, il y existe deux types distincts de fragmentation de l'ADN. Dans un premier temps l'ADN est fragmenté en de grands fragments de 50-300 kilo paires de base (kpb) qui sont identifiables par électrophorèse en champ pulsé (PFGE), et par la suite l'ADN est clivé en des fragments de petits poids moléculaire multiples de 180-200 pb (oligonucléosomes), formant un profil de migration en échelle sur gel d'agarose conventionnel qui correspond au clivage de l'ADN au niveau des régions internucléosomales. Seulement un faible pourcentage de l'ADN est dégradé jusqu'à la formation d'oligonucléosomes, le reste demeurant à l'état de fragments de haut poids moléculaire. Il est apparu avec le nombre croissant de recherches sur l'apoptose que l'ampleur de la fragmentation internucléosomale de l'ADN était variable selon les stimuli et les types de cellules. Les noyaux des cellules où l'ADN est clivé en des fragments de faible poids moléculaire sont plus sensible au processus de dégradation nucléaire que celles ne produisant pas ce type de fragmentation, mais néanmoins ceci n'influença pas en soit le programme de mort cellulaire. La fragmentation internucléosomale de l'ADN apparaît donc comme étant un processus tardif et non-nécessaire dans le mécanisme de mort cellulaire.

La fragmentation de l'ADN débute aux sites d'attachement des domaines à la matrice nucléaire (Walker, Pandey et Sikorska, 1995). La matrice constitue l'endroit où

se déroule également la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN, démontrant ainsi un lien entre le contrôle du cycle cellulaire et des mécanismes de protection du génome et l'induction de l'apoptose. D'autre part, il existe une relation entre les différents stades de fragmentation de l'ADN et les changements morphologiques nucléaires. L'apparition de fragments d'ADN supérieurs à 2 Méga paires de bases (Mpb) est accompagnée de légers changements dans la structure du noyau. La génération subséquente de fragments de hauts poids moléculaire est reliée par la suite à un arrondissement du noyau. La dégradation ultérieure en fragments de 50-300 Kpb coïncide avec l'adoption d'une morphologie condensée de la chromatine. Enfin, la fragmentation de l'ADN jusqu'à la formation d'oligonucléosomes corrèle avec la dégradation complète de la chromatine et la formation de corps apoptotiques. Il est à noter que la fragmentation de l'ADN se produit uniformément à travers le noyau (Ghibelli *et al.*, 1995; Walker et Sikorska, 1997).

Il a été démontré qu'au-delà de vingt activités endonucléasiques différentes pouvaient être reliées au processus de fragmentation de l'ADN au cours du processus d'apoptose (Walker et Sikorska, 1997). Les premières études ont permis d'identifier une classe d'endonucléases  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dépendantes, dont la DNaseI et la Nuc18, et une classe d'endonucléases actives en milieu acide, dont la DNaseII, comme étant impliquée dans l'apoptose. Toutefois, des études subséquentes ont démontré que l'inhibition des caspases bloque la plupart des changements morphologiques se produisant au niveau du noyau, suggérant que certaines activités en aval des caspases exécutrices seraient impliquées dans le démantèlement du noyau. Le DFF45 est un des substrats de la caspase-3 principalement, et de la caspase 7 à un niveau plus faible. Le DFF est une protéine hétérodimérique constitué d'une sous-unité de 40 kDa (DFF40/CAD) et de 45 kDa (DFF45/ICAD) qui est localisé au niveau du noyau (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998; Samejima et Earnshaw, 1998). Le DFF45 possède une fonction de molécule chaperon pour l'enroulement adéquat de DFF40 et une fonction d'inhibiteur de l'activité endonucléasique de DFF40 en formant un complexe avec cette protéine (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998, Sakahira, Enari et Nagata, 1998). La caspase-3 clive DFF45 à deux endroits différents, permettant la libération du DFF40 de son

inhibiteur. Dans le noyau, le DFF40 s'oligomériser avec l'histone H1 et les protéines HMG-1/-2/-7 localisée au niveau des régions internucléosomales qui stimulent son activité endonucléasique (Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999). Une autre protéine nucléaire nommée acinus est clivé par la caspase-3 pour devenir un facteur de condensation de la chromatine (Sahara *et al.*, 1999). Pour être pleinement active, cette dernière doit, outre son clivage après le résidu aspartate (Asp 1093) par la caspase-3, subir un clivage après la sérine 987 (Ser 987) qui est effectué par une protéase encore inconnue. Acinus possède un rôle exclusivement consacré à la condensation de la chromatine et n'induit pas de fragmentation de l'ADN. Enfin, la caspase-6 est responsable du clivage de la lamine nucléaire, une structure rigide à l'intérieur de la membrane nucléaire, activité qui contribue à la condensation de la chromatine (Orth *et al.*, 1996).

D'autre part, plusieurs protéines responsables de la condensation de la chromatine ne dépendent pas de l'activité des caspases. Le facteur d'induction d'apoptose AIF est une flavoprotéine qui est normalement située dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Lors de la transition du potentiel mitochondrial, AIF est transloquée de la mitochondrie au noyau où elle provoque une condensation partielle de la chromatine à la périphérie du noyau, qui est caractérisée par la formation de fragments d'ADN de 50 Kpb (Susin *et al.*, 1999). La protéine L-DNaseII engendre le même type d'activité que AIF. Elle dérive de la protéine inhibitrice de l'élastase des leucocytes, qui suite à une modification post-transcriptionnelle générée par une acidification du cytoplasme, cause la condensation de la chromatine via la dégradation de l'ADN et la formation de fragments de 50 Kpb (Torriglia *et al.*, 1998). De plus, la cathepsine B est une autre protéine dont l'activité cause la formation d'oligonucléosomes suite à sa libération des lysosomes lors de l'apoptose.

Il y a ainsi plusieurs facteurs qui sont impliqués dans la condensation de la chromatine et dans la fragmentation de l'ADN. Zamzani et Kroemer (1999) suggèrent que la présence d'une telle variété de mécanismes aurait pour but d'offrir une action séquentielle, complémentaire ou redondante. De plus, certains facteurs sont exprimés de façon spécifique pour chaque tissu, de sorte que des voies différentes seraient présentes

dans chaque cellule mais cependant avec le même résultat, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN, changements morphologiques se produisant au niveau du noyau lors du processus de mort cellulaire programmée.

## CHAPITRE 2

### Voies de signalisation et apoptose: relation avec le CD45

#### 2.1 Cascade d'événements menant à l'activation des lymphocytes T

Les lymphocytes T jouent un rôle important dans la réponse immunitaire en reconnaissant des peptides dérivés d'antigènes étrangers qui sont associées physiquement à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) présentées à la surface de cellules présentatrices d'antigènes. L'engagement du récepteur à l'antigène des lymphocytes T (TCR) initie le processus d'activation de ces cellules, caractérisé par une cascade d'événements complexes de signalisation à l'intérieur de la cellule menant à l'expression de nouveaux gènes, la synthèse protéique, l'induction des fonctions exécutrices et l'expansion clonale. Les protéines tyrosine kinases et tyrosine phosphatases ont un rôle majeur à jouer dans ces voies de signalisation (Voir figure 5).

Le TCR est une molécule composée d'un hétérodimère polymorphique  $\alpha\beta$  et des sous-unités invariables CD3  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\zeta$ . Les sous-unités  $\alpha\beta$  sont impliquées dans la reconnaissance du peptide antigénique et les chaînes du CD3 dans la transduction de signaux. Ces molécules ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque. Par contre, elles possèdent des motifs d'activation de tyrosine situés sur les immunorécepteurs (ITAM). La phosphorylation de ces ITAM sur les résidus tyrosine lors de l'engagement du TCR leur permet de devenir des sites d'ancrage pour plusieurs protéines nécessaires à l'initiation des signaux biochimiques d'activation.

La phosphorylation sur les résidus tyrosine des chaînes du CD3 est effectuée par des protéines tyrosine kinases de la famille de Src, soit  $p56^{lck}$  et  $p59^{fyn}$ . Alors que Fyn est associée constitutivement au TCR par une interaction directe avec les chaînes  $\epsilon$  et  $\zeta$ , Lck est associé aux corécepteurs CD4 ou CD8. L'activité de ces protéines kinases est régulée par la phosphorylation d'un résidu dans leur portion C-terminale. À l'état phosphorylé, ces protéines interagissent intramoléculairement et adoptent une forme repliée qui inhibe l'activité de l'enzyme. La déphosphorylation de ce site entraîne l'adoption d'une forme dépliée et active de l'enzyme. La protéine tyrosine kinase Csk est responsable de la

régulation négative et la protéines tyrosine phosphatase CD45, dont il sera question plus en profondeur dans une prochaine section, est responsable de la régulation positive de ces enzymes en déphosphorylant leur site catalytique.

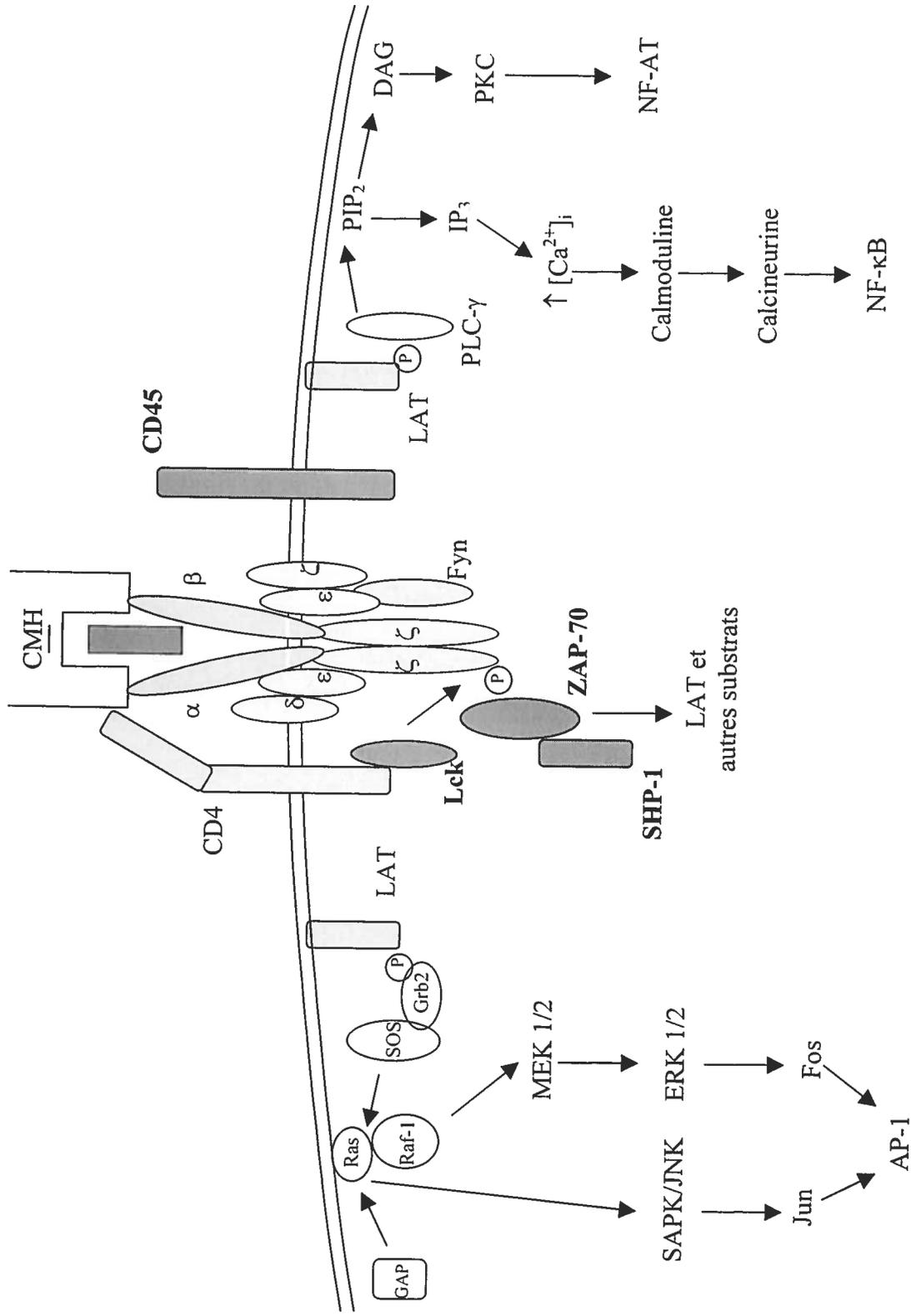
La protéine tyrosine kinase de 70 kDa associée aux chaînes zeta (ZAP-70), un membre de la famille Syk et exprimée exclusivement chez les lymphocytes T, les thymocytes et les cellules Natural Killer (NK), est une des molécules recrutées sur les chaînes du complexe CD3/TCR lors de leur phosphorylation. À l'état normal, cette protéine est localisée dans le cytoplasme et elle se transloque transitoirement au TCR lors de son engagement. L'interaction entre ZAP-70 et le complexe CD3/TCR est dynamique, ZAP-70 passant rapidement et successivement de la forme liée à la forme non-liée. Ce mode d'interaction procure un mécanisme de régulation potentiel de cette protéine car les phosphatases ont accès aux ITAM lorsque ZAP-70 se retrouve non-liée au complexe, engendrant ainsi un processus de compétition entre les signaux de régulation positive et négative. Suite à son recrutement sur les ITAM phosphorylées, ZAP-70 devient phosphorylée à son tour et acquiert son activité enzymatique. ZAP-70 est responsable de la phosphorylation de la protéine de liaison pour l'activation des lymphocytes T (LAT), qui est située au niveau de la membrane plasmique et qui joue un rôle important dans le recrutement de molécules de signalisation requises pour la transmission des voies intracellulaire. La protéine adaptatrice LAT sert de lien entre les protéines kinases activées à la surface de la cellule et leurs substrats. Elle est reconnue pour s'associer avec les protéines Grb2, phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) et phospholipase C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1) suite à sa phosphorylation par ZAP-70.

La protéine Grb2 joue un rôle d'adaptateur en couplant les signaux membranaires avec le facteur d'échange guanine-nucléotide SOS et ainsi aux voies de signalisation médiée par Ras. Grb2 interagit également avec le proto-oncogène Cbl, la protéine adaptatrice SLP-76 et l'adaptateur Shc. La protéine Ras est régulée par les actions opposées du facteur SOS qui entraîne la formation de la forme active Ras-Guanosine triphosphate (Ras-GTP), et des protéines d'activation des GTPases (GAP) qui convertissent Ras à sa forme inactive couplée au guanosine diphosphate (GDP). La protéine Ras fait partie de la

famille des petites protéines G dont l'une des voies de signalisation la plus importante est celle menant à l'activation de la voie des protéines kinases activées par des mitogènes/protéines kinases régulées par l'extérieur (MAPK/ERK). Cette voie consiste en une séquence de trois kinases qui inclue une MAPK, qui est activée par une MAPK/ERK kinase (MEK) qui est elle-même activée par une MEK kinase (MEKK). Par exemple, Raf (une MEKK) engendre l'activation de MEK 1/2 qui active ensuite ERK 1/2 menant à la phosphorylation de c-Fos. Par ailleurs, un autre groupe de MAPK est activée par des stimuli de stress cellulaire et des cytokines proinflammatoires. Il s'agit des protéines kinases activées par le stress (SAPK) qui seraient activées par la protéine Rac. Les SAPK ont pour fonction de phosphoryler c-Jun et sont donc aussi appelées Jun kinases (JNK). La phosphorylation et l'activation de c-Fos et c-Jun par ces deux voies de signalisation entraînent la formation du complexe AP-1, qui est un facteur de transcription important dans l'expression de plusieurs cytokines.

D'autre part, l'activation de la protéine PLC- $\gamma$ 1 par LAT provoque l'hydrolyse d'un résidu phospholipide membranaire appelé le phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP<sub>2</sub>) et la génération d'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et de diacylglycérol (DAG). Le facteur IP<sub>3</sub> provoque ensuite la libération de Ca<sup>2+</sup> séquestrés dans les réservoirs intracellulaires. Cette élévation de calcium à l'intérieur de la cellule favorise l'activation de la phosphatase calcineurine qui est impliquée dans l'activation du facteur nucléaire des cellules T activées (NF-AT). Le DAG quant à lui, active la protéine sérine/thréonine kinase PKC dont l'action est responsable entre autre de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. (Sloan-Lancaster et Samelson, 2000; Gomez *et al.*, 1998).

Par ailleurs, la protéine PI3K est composée d'une sous-unité régulatrice de 85 kDa (p85) et d'une sous-unité catalytique de 110 kDa (p110) (Sabbatini et McCormick, 1999). PI3K est activée par l'interaction de la sous-unité régulatrice p85 avec des résidus tyrosine phosphorylés suite à l'activation des lymphocytes T ou par l'arrivée de stimuli comme les facteurs de croissance. Ceci mène à la translocation de PI3K à la membrane plasmique et à l'activation de la sous-unité catalytique p110. La sous-unité p100 activée



**Figure 5 :** Interactions moléculaires menant à l'activation des lymphocytes T suite à la liaison du TCR.

(Modifié de Sloan-Lancaster et Samelson, 2000)

phosphoryle les résidus phosphoinositides (PI) en position 3 du cycle inositol pour générer les seconds messagers PI3P, PI(3,4)P2 et PI(3,4,5)P3 (Kandel et Hay, 1998). Ces molécules vont servir de protéines adaptatrices pour plusieurs molécules dont la protéine Akt/PKB, qui est impliquée dans la progression du cycle cellulaire et la génération de signaux anti-apoptotiques (Sabbatini et McCormick, 1999; Kandel et Hay, 1998).

Enfin, la tyrosine phosphatase contenant des domaines d'homologie à Src de type 2 (SHP-1) est impliquée dans la régulation négative de certains récepteurs dont le TCR (Cuevas *et al.*, 1999). SHP-1 peut s'associer avec ZAP-70 et cette association entraîne l'augmentation de l'activité de SHP-1 et une diminution de l'activité de ZAP-70. De plus, il a été démontré que SHP-1 peut causer la déphosphorylation de certains composants du TCR et de molécules signalisatrices et diminuer l'activité de p56<sup>lck</sup> et de PI3K (Cuevas *et al.*, 1999). SHP-1 est phosphorylée sur les résidus tyrosine en réponse à la stimulation par le CD4 ou CD8 et par l'activation de p56<sup>lck</sup>. On retrouve chez les souris déficientes pour l'expression de cette protéine, une plus grande réponse proliférative suite à la stimulation du TCR contrairement aux souris normales, démontrant l'importance de cette protéine dans la régulation de la transmission des signaux suite à l'activation des lymphocytes T (Cuevas *et al.*, 1999).

## **2.2 Événements de signalisation impliqués dans l'apoptose**

Comme il a été mentionné plus tôt, le sort d'une cellule dépend de la balance entre les signaux de survie et les signaux de mort qu'elle reçoit. Les voies de signalisation menant à la prolifération de la cellule et celles menant à la mort cellulaire par apoptose sont intimement liées et les mécanismes d'intégration des signaux qui régulent l'activité des enzymes situées le long de ces deux voies sont très complexes. Une fine régulation des signaux pro-apoptotiques et anti-apoptotiques est très importante car une mort cellulaire inappropriée est aussi néfaste à l'organisme que peut l'être une division cellulaire inappropriée. À cet effet, il n'est pas surprenant de constater que plusieurs protéines impliquées dans l'activation des lymphocytes T puissent avoir un rôle à jouer dans la transduction des signaux pro- et anti-apoptotiques.

### 2.2.1 Signalisation proapoptotique

Deux voies de signalisation majeures existent à l'intérieur de la cellule: une pour la prolifération médiée par les MAPK/ERK et une pour la réponse au stress cellulaire médiée par les SAPK/JNK (Denis *et al.*, 1998). Ces deux voies sont initiées par Ras et vont ultimement mener à l'activation de facteurs de transcription (voir figure 5). Alors que la voie des MAPK protège de l'induction d'apoptose, la voie des SAPK est activée par des stimuli pro-apoptotiques. Par exemple, MEKK-1, une protéine sérine/thréonine kinase de 196 kDa, est activée en réponse à des dommages génotoxiques, suite à la liaison de Fas et suite au détachement cellulaire (Widmann *et al.*, 1998). La surexpression de cette protéine peut provoquer l'apoptose de plusieurs types de cellules, et l'inhibition du domaine kinase inhibe l'apoptose induite par les agents génotoxiques et le détachement cellulaire (Jarpe *et al.*, 1998). L'action apoptotique de MEKK-1 implique l'activation de JNK et son clivage par les caspases et l'activation subséquente de celles-ci par MEKK-1 selon un modèle de rétroaction positive.

Plusieurs autres protéines kinases sont activées lors de l'induction d'apoptose. Parmi celles-ci, il y a la tyrosine kinase c-Abl, la protéine kinase associée PAK, la protéine adaptatrice Crk et les protéines sérine/thréonine kinases ASK1 et MKK3/MKK6 (Jarpe *et al.*, 1998). La plupart de ces protéines sont des activateurs des SAPK p38 et JNK. Bien que JNK ne soit pas nécessaire à tous les stimuli apoptotiques, il a été démontré que l'activité de cette protéine était essentielle au déroulement du processus d'apoptose lors du stress cellulaire induit par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), les rayons ultraviolets (UV), les radiations, le choc thermique et le TNF- $\alpha$ .

La liaison du récepteur de mort Fas implique l'activation de plusieurs tyrosine kinases. Il a été démontré qu'une augmentation rapide de phosphorylation sur les résidus tyrosine de plusieurs protéines et une augmentation de l'activité tyrosine kinase se produisaient suite à la liaison de Fas (Eischen, Dick et Leibson, 1994). Les protéines kinases activées incluraient notamment p56<sup>lck</sup>, p59<sup>fyn</sup> et p120 c-cbl (Schlottmann *et al.*, 1996). L'inhibition des tyrosines kinases par le tyrphostin inhibe complètement l'induction de l'apoptose par Fas. De plus, il a été démontré que p56<sup>lck</sup> et p59<sup>fyn</sup> sont

associés à Fas à l'état de repos, démontrant le rôle possiblement important de ces protéines dans les signaux pro-apoptotiques émis suite à la liaison de Fas. Par ailleurs, la protéine p56<sup>lck</sup> joue également un rôle essentiel à l'apoptose des lymphocytes T matures suite à la liaison du TCR (Di Somma *et al.*, 1995; Gonzalez-Garcia *et al.*, 1997). Dans ce type d'apoptose, p56<sup>lck</sup> agit en contrôlant l'expression du récepteur Fas. Les cellules ayant reçu un signal d'activation via leur TCR voient leur nombre de molécules Fas augmenter à la surface membranaire, devenant ainsi plus sensible à l'induction d'apoptose par FasL. Ce type d'apoptose est appelé la mort cellulaire induite par l'activation (AICD) et contribue à l'élimination des cellules activées devenues trop nombreuses et potentiellement dangereuses à la fin de la réponse immunitaire. Comme il a été mentionné précédemment, la liaison du récepteur de mort Fas provoque une augmentation transitoire de la phosphorylation sur les résidus tyrosine de plusieurs protéines intracellulaires. L'ajout de pervanadate, un inhibiteur de tyrosine phosphatases entraînant une augmentation de phosphorylation sur les résidus tyrosines à l'intérieur de la cellule, inhibe l'apoptose induite par CD95/Fas (Hehner *et al.*, 1999). L'inhibition se produit au cours de la phase initiale du processus apoptotique avant la diminution du potentiel membranaire de la mitochondrie et cause un retardement du clivage et de l'activation de la caspase-3 et de la caspase-8. Ces résultats démontrent clairement l'implication des tyrosines phosphatases dans les événements de signalisation essentiels à l'induction d'apoptose suite à la liaison du récepteur Fas.

### **2.2.2 Signalisation antiapoptotique**

Le processus de mort cellulaire peut être régulé par les signaux anti-apoptotiques par l'inhibition directe des caspases, par l'inhibition des signaux pro-apoptotiques ou par l'élimination du stimuli apoptotique. Ces signaux anti-apoptotiques peuvent être médiés par exemple par les protéines kinases PI3K, Akt/PKB, p42/p44 MAPK ou ERK et Raf-1. Les protéines ERK sont activées par différents stimuli dont les facteurs de croissance, les hormones et les cytokines. Plusieurs études ont démontré que les protéines kinases ERK protègent contre certains stimuli pro-apoptotiques comme l'absence de sérum, les rayons UV et le TNF- $\alpha$  mais toutefois, leurs substrats demeurent encore inconnus. Par ailleurs, la protéine PI3K protège contre l'absence de sérum et l'apoptose induite par c-Myc.

L'action protectrice de PI3K serait médiée par la protéine sérine/thréonine kinase Akt/PKB qui est activée par PI3K. Il a été démontré que les activités anti-apoptotiques de la protéine Akt/PKB consistent en l'inhibition de l'activité de la caspase-9 et l'inactivation de la protéine Bad, un membre proapoptotique de la famille du Bcl-2, par la phosphorylation de celles-ci. D'autre part, la protéine Raf-1, qui est un activateur des protéines ERK, possède un rôle dans la signalisation antiapoptotique. Raf-1 est recruté au niveau de la mitochondrie par la molécule Bcl-2, où Raf-1 induirait la phosphorylation de la protéine Bad. Le maintien de l'équilibre entre signaux de survie et signaux de mort est important pour l'homéostasie de la cellule. L'activité de plusieurs protéines anti-apoptotiques, dont celles mentionnées ci-haut, est inhibée par leur clivage spécifique par les caspases lors de l'induction d'apoptose (Widmann, Gibson et Johnson, 1998). Ce mécanisme constitue un exemple par lequel la cellule élimine des signaux anti-apoptotiques afin de favoriser l'induction de mort cellulaire.

Par ailleurs, les phosphatases sont des protéines qui jouent un rôle important dans les cascades de transduction de signaux à l'intérieur de la cellule. Il a été démontré que le maintien de l'activité des protéines sérine/thréonine phosphatases est essentielle au maintien de l'intégrité cellulaire. En effet, l'ajout d'inhibiteurs de sérine/thréonine phosphatases chez des cellules hépatocytaires, fibroblastiques, promyélocytiques et lymphoïdes provoque une induction rapide de l'apoptose de celles-ci (Fladmark *et al.*, 1999). Ce processus d'induction d'apoptose est dépendant de l'activité de la caspase-3 et nécessite l'inhibition des protéines phosphatases PP1 et PP2A. Ainsi, l'activité normale des protéines sérine/thréonine phosphatases, permettant de conserver un niveau normal de phosphorylation à l'intérieur de la cellule à l'état basal, agit comme un élément répressur de l'initiation d'apoptose et assure la survie de la cellule.

## **2.3 Le CD45**

### **2.3.1 Structure et isoforme**

Le CD45 est exprimé exclusivement chez les cellules hématopoïétiques nucléées et constitue la protéine tyrosine phosphatase transmembranaire la plus importante du système immunitaire. Il représente environ 10% des glycoprotéines de surface et peut,

jusque dans certains cas, compter pour 90 % de l'activité tyrosine phosphatase transmembranaire (Trowbridge et Thomas, 1994). Comme la plupart des récepteurs tyrosine phosphatases transmembranaire, le CD45 est constitué d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et de deux domaines phosphatases intracellulaires (Byon *et al.*, 1997). Plusieurs isoformes du CD45 sont générées par l'épissage alternatif de trois exons qui encodent pour la portion extracellulaire N-terminale du CD45. L'utilisation variable des exons 4, 5 et 6 produit 8 isoformes différentes dont le poids moléculaire se situe entre 180 et 240 kDa (Trowbridge et Thomas, 1994). Le domaine extracellulaire est composé d'une région "mucin-like", qui inclue les régions codés par les exons épissés, un petit domaine riche en cystéines et trois domaines fibronectine de type III (fn3) dont la structure consiste en deux feuillets  $\beta$  antiparallèles similaire à la structure des immunoglobulines (Symons, Willis et Barclay, 1999). L'expression des trois exons 4, 5 et 6 double la longueur totale du domaine extracellulaire de CD45, faisant passer celle-ci de 28 nanomètres (nm) pour l'isoforme CD45RO à 53 nm pour l'isoforme CD45RABC.

### **2.3.2. Rôle dans les cellules du système immunitaire**

L'activité du CD45 est essentielle à la transduction de signaux menant à l'activation des lymphocytes B et T suite à la liaison du BCR et du TCR respectivement. La détermination de l'importance de l'expression du CD45 dans l'activation des lymphocytes T est venue d'études montrant que des lymphocytes T non-transformés déficients en CD45 étaient incapable de proliférer ou de produire des cytokines en réponse soit à une stimulation antigénique du TCR ou soit à une liaison du CD3 par des anticorps monoclonaux. De plus, les révertants CD45 positifs dérivés des ces clones de lymphocytes T déficients regagnent leur susceptibilité à ces stimulations, démontrant de cette façon le rôle spécifique du CD45 dans ces processus (Pinkel et Thomas, 1989). Par ailleurs, des études chez des lignées de cellules leucémiques ont démontré que la transduction de signaux initiée par la liaison du TCR était interrompu en absence du CD45 et que la présence du CD45 est requise pour l'augmentation de calcium, la génération d'inositol phosphates, la phosphorylation sur les résidus tyrosine et la production d'IL-2 après la reconnaissance de l'antigène (Trowbridge et Thomas, 1994).

D'autre part, la génération de souris déficientes pour l'expression du CD45 a démontré que celui-ci avait également un rôle à jouer dans le développement du système immunitaire (Kishihara *et al.*, 1993; Byth *et al.*, 1996). Chez les souris dont l'exon 6 du CD45 a été enlevé et chez qui le CD45 ne peut être détecté, un nombre normal de thymocytes est retrouvé dans le thymus. Toutefois, le nombre de cellules CD4 et CD8 simple positive matures est fortement réduit démontrant que le CD45 a un rôle à jouer dans la différenciation des thymocytes. De plus, l'analyse de la faible quantité de lymphocytes T périphériques générés a démontré que ceux-ci étaient inaptes à être stimulés (Kishihara *et al.*, 1993). La génération d'une souris déficiente pour toutes les isoformes du CD45 a démontré que le développement des lymphocytes T était inhibé à deux stades. Le développement des thymocytes CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> en thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> est réduit de deux fois et la maturation subséquente des thymocytes double positifs en leur forme mature simple positive est réduite de quatre à cinq fois. De plus, les thymocytes issus des souris déficientes sont résistants à l'apoptose induite par la liaison du TCR mais pas par des stimuli apoptotiques indépendants du TCR (Byth *et al.*, 1996).

### **2.3.2.1. Importance des différents domaines structuraux du CD45**

La création de molécules chimériques a permis de démontrer l'importance relative de chaque domaine structural dans la fonction biologique du CD45. Trois types de protéines chimères ont été générées : 1) une protéine chimère comprenant un signal de localisation à la membrane plasmique et le domaine cytoplasmique du CD45 exprimée chez des cellules YAC-1 déficientes en CD45 (Hovis *et al.*, 1993), 2) une protéine chimère comprenant le domaine extracellulaire et la région transmembranaire d'une protéine de classe I du CMH et le domaine cytoplasmique du CD45 exprimée chez des cellules Jurkat CD45 négatives (Volaveric *et al.*, 1993), 3) une protéine chimère comprenant le domaine extracellulaire et la portion transmembranaire du récepteur de EGF (EGFR) et le domaine cytoplasmique du CD45 chez des cellules HPB-ALL CD45 négatives (Desai *et al.*, 1993). Les résultats ont démontré chez les trois études que la présence du domaine cytoplasmique du CD45 est suffisante pour restaurer les événements de transduction de signaux chez les cellules CD45 négatives. Il apparaît donc que les

domaines extracellulaires et transmembranaires du CD45 ne sont pas requis pour la signalisation via le TCR (Trowbridge et Thomas, 1994). Un phénomène intéressant est survenu lors de l'ajout de facteur de croissance épidermal (EGF) chez les cellules possédant la molécule chimérique EGF/CD45. Alors que l'ajout de cette molécule restaure la signalisation via le TCR comme mentionné précédemment, la stimulation de ces cellules avec le EGF bloque la signalisation via le TCR. La liaison du EGF entraîne la dimérisation du récepteur qui induirait une régulation négative du CD45 (Desai *et al.*, 1993). Il a ultérieurement été déterminé que cette inhibition est causée par la dimérisation des domaines phosphatases à l'intérieur de la cellule au cours de laquelle le site catalytique d'une molécule est bloqué par des contacts spécifiques avec une portion de l'autre molécule et vice-versa (Majeti *et al.*, 1998). Ceci procure comme modèle que les récepteurs protéines tyrosine phosphatases sont régulés de façon négative suite à leur dimérisation.

Par ailleurs, le mécanisme par lequel la région extracellulaire affecte l'activité tyrosine phosphatase et le rôle des différentes isoformes dans l'activation des lymphocytes T demeure encore nébuleux. La transfection du cDNA encodant la portion CD45RO ou la portion CD45RABC engendre une variation marquée dans la production d'IL-2 et dans la phosphorylation sur les résidus tyrosine de certaines protéines dont Vav suite à la stimulation par la CD3 démontrant que les isoformes régulent différemment la voie d'activation des lymphocytes T (McKenney *et al.*, 1995). De plus, l'expression des isoformes du CD45 est hautement régulée lors de la différenciation cellulaire. Bien qu'individuellement, les lymphocytes expriment simultanément plus d'une isoforme, l'expression des isoformes est différente entre les lymphocytes B et les lymphocytes T, de même qu'entre les différents types fonctionnels de cellules T. L'expression chez une même cellule varie également lors de la sélection thymique et lors de l'engagement du récepteur à l'antigène en périphérie mais la fonction biologique de chaque isoforme demeure encore à déterminer (Trowbridge et Thomas, 1994; Byon *et al.*, 1997).

### **2.3.2.2 Régulation des membres de la famille Src**

L'incapacité des lymphocytes T CD45 négatifs à transmettre correctement les signaux suite à une stimulation est due à une régulation déficiente des protéines tyrosine kinases de la famille Src. Les protéines p56<sup>lck</sup> et p59<sup>fyn</sup> sont deux substrats physiologiques majeurs du CD45 et sont les premières protéines impliquées dans la cascade d'événements menant à l'activation des lymphocytes. Chez les cellules CD45 négatives, il y a une augmentation de phosphorylation sur ces protéines qui est généralement reconnue pour causer une réduction de l'activité de ces enzymes (Trowbridge et Thomas, 1994). Les protéines kinases de la famille Src possèdent deux sites de phosphorylation régulateurs sur les résidus tyrosine: un site d'autophosphorylation situé dans le domaine kinase, et un site de régulation situé dans la queue C-terminale (Thomas et Brown, 1999). La phosphorylation du site situé dans le domaine kinase (tyrosine 394 dans le cas de Lck) active la fonction catalytique de l'enzyme en provoquant un changement de conformation du domaine kinase. La phosphorylation du résidu C-terminal (tyrosine 505 et 528 pour p56<sup>lck</sup> et p59<sup>fyn</sup>, respectivement) inhibe l'activité enzymatique en permettant une interaction intramoléculaire entre la portion C-terminale et la région d'homologie à Src de type 2 (SH2) de l'enzyme (Gervais et Veillette, 1997). Le CD45, en effectuant la déphosphorylation du site inhibiteur C-terminal, joue un rôle essentiel à l'activation de ces protéines kinases qui initient la transduction de signaux (Thomas et Brown, 1999).

L'action du CD45 sur la déphosphorylation du site inhibiteur des protéines kinases p56<sup>Lck</sup> et p59<sup>Fyn</sup> est en compétition avec la protéine p50<sup>Csk</sup>, une protéine tyrosine kinase exprimée chez tous les types cellulaires, dont l'action est de phosphoryler ce même site inhibiteur. Le CD45 et Csk sont des enzymes dont l'expression est constitutive, de sorte qu'elles s'opposent continuellement sur le site inhibiteur. Cependant, la meilleure efficacité catalytique du CD45 résulte en la déphosphorylation de ce site à l'état basal. Lors de l'engagement du TCR, il y a séquestration des protéines kinases Src avec le récepteur et la formation de sites d'engagement d'où le CD45 est exclu. C'est à ce moment que les kinases Src sont phosphorylées sur leur domaine kinase entraînant leur activation. Le CD45 étant exclu des ces sites d'engagement, il ne peut causer la déphosphorylation du site d'autophosphorylation de ces kinases et il est ainsi considéré

comme un régulateur positif de ces enzymes. Il est suggéré que le grand domaine du CD45 est responsable de l'absence d'interaction avec les récepteurs activés aux sites d'engagement (Thomas et Brown, 1999).

### **2.3.2.3. Autres substrats du CD45**

Il a été démontré que le CD45 possède plusieurs substrats à l'intérieur de la cellule, mais le sens de toutes ces interactions demeure encore à définir. Le domaine cytoplasmique du CD45 interagit et est activé suite à son interaction avec la fodrine, une protéine du cytosquelette, et cette interaction serait de plus importante pour l'interaction avec d'autres protéines de surface (Lokeshwar et Bourguignon, 1992). Il a aussi été déterminé que le CD45 interagit avec la molécule Thy-1 (Volarevic *et al.*, 1990), le CD2 (Schraven, 1990), les chaînes  $\zeta$  du TCR (Fukurama, 1994), ZAP-70 (Mustelin *et al.*, 1995), avec la protéine associée au CD45 (CD45-AP) (Takeda *et al.*, 1994; Schraven *et al.*, 1992), et avec une glycoprotéine de 116 kDa nommée alpha-glucosidase II (Arendt et Ostergaard, 1997). La protéine CD45-AP est constitutivement associée au CD45 chez les lymphocytes T et cette molécule, qui peut se lier avec les protéines ZAP-70 et p56<sup>lck</sup>, servirait d'adaptateur au CD45 afin de l'amener à proximité de ses substrats potentiels (Motoya *et al.*, 1999; Veillette *et al.*, 1999). Enfin, la forme phosphorylée du CD45 servirait de protéine d'ancrage pour des composantes de la voie de signalisation médiée par Ras, soit les protéines rasGAP, Grb2, SOS et Vav chez les lymphocytes T (Lee *et al.*, 1996), et serait couplée à la voie p21ras chez les lymphocytes B (Pao *et al.*, 1997).

### **2.4. Implication du CD45 dans l'apoptose**

Certaines études ont démontré que le CD45 a une implication dans l'induction de la mort cellulaire par apoptose. Tout d'abord, il a été démontré que le CD45 régule l'apoptose induite par de l'ATP provenant du milieu extracellulaire et par les lymphocytes T cytotoxiques (Macino *et al.*, 1996). L'absence du CD45 sensibilise les cellules lymphoïdes L1210 à ces stimuli apoptotiques, lui conférant ainsi un rôle protecteur. D'autre part, il a été démontré par deux études indépendantes que la liaison de la région extracellulaire du CD45 par des anticorps monoclonaux peut induire l'apoptose chez les lymphocytes B et T périphériques et l'apoptose spécifique de la sous-population

de thymocytes immatures  $CD4^+CD8^+$  (Klaus *et al.*, 1996; Lesage *et al.*, 1997). Le processus de mort cellulaire est caractérisé dans ces conditions par une réduction du potentiel membranaire mitochondrial, une production d'espèces oxygénées réactives (ROS), une perte d'asymétrie membranaire et une exposition des phosphatidylsérines. De plus, ces études ont montré que l'apoptose engendrée par le CD45 ne mène pas à la condensation nucléaire et à la fragmentation de l'ADN (Klaus *et al.*, 1996; Lesage *et al.*, 1997).

Par ailleurs, le CD45 peut être lié *in vivo* par son ligand naturel, la galectine-1, qui est exprimée sur les cellules épithéliales du thymus (Perillo *et al.*, 1995; Perillo *et al.*, 1997). Il a été démontré que la galectine-1 est un agent inducteur d'apoptose et que la sous-population de thymocytes  $CD4^{lo}CD8^{lo}$  sensible à son action est similaire à la sous-population de thymocytes susceptible à la liaison du CD45 par des anticorps monoclonaux ( $CD4^+CD8^+$ ). Ces résultats démontrent qu'à l'intérieur de l'organisme, la liaison du CD45 pourrait participer à l'élimination des thymocytes non-sélectionnés ou sélectionnés négativement par apoptose, contribuant ainsi au phénomène de maturation des thymocytes (Perillo *et al.*, 1997; Lesage *et al.*, 1997). Les études effectuées sur les phénomènes engendrés lors de la liaison directe du CD45 font un lien entre cette liaison et l'apparition des changements morphologiques typiques de l'apoptose et ont défini les sous-populations de cellules sensibles à son action. Cependant, ces études se sont arrêtées au stade de l'observation et ne permettent pas d'éclaircir le mode d'action du domaine intracellulaire du CD45 dans l'induction du processus d'apoptose.

Par ailleurs, le fait que le principal substrat du CD45,  $p56^{lck}$ , soit physiquement associé avec le récepteur Fas et que des études précédentes avaient démontré l'importance des événements de phosphorylation sur les résidus tyrosine pour la signalisation apoptotique initiée suite à l'engagement de APO-1/Fas, a amené des chercheurs à poser l'hypothèse que le CD45 puisse être impliqué dans cette induction d'apoptose. Cependant, ces études ont démontré que l'apoptose médiée par la liaison de Fas peut être induite chez des cellules déficientes pour l'expression du CD45, ce qui permet d'écarter l'implication du CD45 les événements cellulaires induits par la liaison de celui-ci

(Schraven *et al.*, 1995; Latinis *et al.*, 1996). Dans cette perspective, le CD45 ne semblerait pas impliqué dans la voie de signalisation proximale et directe médiée par Fas mais il serait plutôt impliqué, tout comme il a été démontré pour p56<sup>lck</sup>, dans la voie de signalisation induite par l'engagement du TCR menant à l'augmentation de l'expression de CD95/Fas à la surface de la cellule lors du phénomène d'AICD.

## CHAPITRE 3

### LES ORGANOÉTAINS

#### **3.1 Utilisations des organoétains**

Les composés organoétains sont principalement d'origine anthropogénique. Ils résultent de l'ajout d'un ou de plusieurs groupements organiques sur un atome d'étain inorganique. Ils peuvent également être d'origine naturelle, tel que caractérisé par la formation de méthylétain par biométhylation environnementale (Guard, Cobet et Coleman, 1981). L'utilisation industrielle du premier composé organoétain, en tant qu'agent stabilisateur pour des polymères synthétiques, remonte à 1936 (Fent, 1996). La découverte des propriétés biocides des trialkylétains dans les années 1950 a par la suite entraîné une augmentation de la variété des applications, du niveau de production et de la consommation des organoétains.

Les trialkylétains sont exploités pour leurs propriétés fongicides, bactéricides, algicides et acaricides. Le tributylétain (TBT), qui est toxique pour les bactéries gram positives, est combiné avec des bactéricides gram négatifs pour la désinfection de surfaces telles que les planchers d'hôpitaux et d'arénas (Ascher, 1985). Le TBT est également utilisé dans les formulations préservatives pour bois, textiles, coton, papier, cuir, peintures et teintures (Organisation mondiale de la santé (WHO), 1990). L'utilisation principale du TBT réside cependant dans son emploi dans les peintures antifoulantes, contenant jusqu'à 20% de TBT, servant à revêtir les surfaces exposées au milieu aquatique afin de prévenir l'attachement et la croissance de moules, planctons, algues et autres organismes aquatiques. Ces peintures sont entre autres utilisées sur les coques de navires et de bateaux de plaisance, les quais, les bouées, les filets de pêche et les tuyaux de prise d'eau (Cooney, Weber et Sherman, 1994).

#### **3.2 Contamination de l'environnement**

Les composés organoétains employés en tant qu'agent biocide représentent une grande source d'organoétains libres dans l'environnement, dû à leur introduction directe dans le sol, l'air et l'eau (Blunden, Hobbs et Smith, 1984). Le TBT est présent dans les

peintures antisalissures sous forme d'un polymère organométallique. La lente hydrolyse de celui-ci dans l'eau entraîne la formation d'une fine couche concentrée en TBT à l'interface immédiate de la surface peinte (Ascher, 1985 ; Huggett et al. 1992). Cette couche sert à repousser les organismes nuisibles mais entraîne cependant la diffusion du TBT dans le milieu aquatique. Les dérivés organoétains sont beaucoup plus toxiques que l'atome d'étain inorganique et la toxicité de ceux-ci est déterminée par le nombre et la nature des groupements organiques qui les composent. La toxicité augmente en fonction du nombre de groupements organiques sur l'atome d'étain avec un maximum pour les trialkylétains et diminue avec l'augmentation de la longueur de la chaîne organique (WHO, 1980; WHO, 1990). Le TBT est reconnu comme étant l'espèce organoétain la plus réactive, de sorte qu'il est donc d'une particulière importance de déterminer et contrôler sa présence dans l'environnement et d'évaluer son impact sur les différents organismes avec lesquels il entre en contact.

### **3.2.1 Législation sur le TBT et présence dans l'environnement**

Au cours des années 1970, l'utilisation du TBT a énormément augmenté, notamment grâce à son utilisation au niveau des peintures antisalissures sur les bateaux de plaisance, les navires commerciaux et les quais. Dû à la nature de ces peintures, il en a résulté une contamination importante dans les ports, les marinas et les régions côtières. Les premiers travaux démontrant l'effet nocif de la présence du TBT dans l'environnement sont ceux de Alzieu *et al.* (1982) dans lesquels une corrélation est faite entre la présence de TBT dans la Baie d'Arcachon en France et les anomalies de calcification observées chez les coquilles de l'huître *Crassostrea gigas*. Par la suite, Waldock et Thain (1983) ont démontré que la bioaccumulation du TBT était associée à des aberrations morphologiques chez les huîtres et les moules. D'autre part, chez le néogastropode *Nucella lapillus*, il a été répertorié des conditions d'imposex ou de pseudohermaphrodisme, où la femelle développe des organes sexuels mâles comme le pénis et le vas déferens (Gibbs et Bryan, 1986; Gibbs, Pascoe et Bunt, 1988). Cette condition amène de graves perturbations sur la reproduction de ces gastropodes et le déclin progressif de l'espèce dans les endroits où les études ont été menées (Bryan *et al.*, 1986). Le mécanisme proposé pour l'induction d'imposex serait une inhibition par le

TBT de l'aromatase cytochrome P450-dépendante responsable de la conversion de la testostérone en  $17\beta$ -estradiol, entraînant ainsi une accumulation de testostérone chez les femelles (Oelmann *et al.*, 1993; Stroben, Oelmann et Bettin, 1991).

Les effets toxiques du TBT répertoriés sur des organismes aquatiques non ciblés par son utilisation ont contribué à l'adoption de restrictions concernant son usage dans les peintures antifoulantes. La France a été le premier pays en 1982 à légiférer sur l'utilisation du TBT en bannissant l'emploi de ces peintures sur les bateaux ayant moins de 25 mètres de carène. Une législation similaire a été adoptée au Royaume-Uni en 1987 et élargie sur les filets de pêche. De plus, des normes environnementales de 20 ng/l pour l'eau douce et de 2 ng/l pour l'eau de mer ont été définies (WHO, 1990). Les États-Unis ont par la suite entériné le "Organotin Antifouling Paint Control Act of 1988" restreignant l'utilisation du TBT sur les bateaux de moins de 25 mètres, exemptant toutefois de cette législation les bateaux n'étant pas fait en aluminium. De plus, cette législation stipulait que le taux de libération du TBT des peintures antifoulantes ne devait pas être supérieur à  $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{jour}$  (Huggett *et al.*, 1992). Au Canada, une loi similaire a été entérinée en 1989, et avant la fin de 1990; d'autres pays tels le Japon, la Suisse, l'Allemagne, l'Australie et plusieurs autres avaient également procédé à l'introduction de la législation.

### **3.2.2 Le devenir du TBT dans l'eau**

En fonction du temps, le TBT subit un processus de dégradation entraînant la déalkylation du composé en dibutylétain (DBT) et monobutylétain (MBT), menant éventuellement à la formation de  $\text{Sn}^{4+}$  (Maguire, Carey et Hale, 1983; Selnigan, Valkirs et Lee, 1986). Dans l'eau, le temps de demi-vie du TBT est de 7 à 30 jours en période chaude et de plus de 2 mois en des conditions hivernales. La principale voie de dégradation du TBT dans l'environnement est la biodégradation médiée par les algues, les bactéries et autres organismes marins (Fent, 1996). Ce processus est dépendant de certaines conditions environnementales telles que le pH, la température, le taux d'oxygène et la nature des micro-organismes en présence. Le mécanisme d'action du phénomène de biodégradation n'est pas encore connu mais chez les bactéries, il pourrait

impliquer une enzyme semblable à la lyase qui catalyse le clivage du lien carbone-mercure (Fent, 1996).

### **3.2.3 Bioaccumulation du TBT et exposition des humains via la diète**

Des indices de bioaccumulation du TBT le long de la chaîne alimentaire ont été démontrés chez plusieurs organismes, dont les moules et les crabes. Résultat de leur mode caractéristique d'alimentation, les bivalves ont été utilisés comme organismes sentinelles dans plusieurs études désirant évaluer la contamination des écosystèmes aquatiques. Par exemple, chez le mollusque *Mya arenaria*, qui a une faible capacité à métaboliser et à éliminer le TBT, des niveaux de TBT allant jusqu'à 4.2 µg/g (poids sec) ont pu être observés (Kure et Depledge, 1994). Les concentrations en TBT ont également été déterminées chez plusieurs autres organismes et des facteurs de bioconcentration variant entre 100 et 500 000 ont été retrouvés chez certains organismes, dont les micro-organismes, les macroalgues, les invertébrés, les poissons, les oiseaux et les mammifères (Laughlin, 1996).

Le fait que les organismes marins aient tendance à bioaccumuler le TBT laisse présager que celui-ci peut entrer ainsi directement dans la diète des humains. Chez des saumons élevés dans des cages traitées au TBT, des niveaux de 0.3 à 0.9 µg/g ont été retrouvés lors d'une étude menée au États-Unis en 1987 (Short et Thrower, 1986; Short et Thrower, 1987). Toujours aux États-Unis, des saumons d'élevage vendus dans différents marchés publics se sont révélés contenir des concentrations de 0.08 à 0.2 µg/g. De plus, il s'avère que la cuisson n'élimine que 24 à 45 % du contenu total en TBT, démontrant ainsi l'évidence de l'entrée du TBT dans la diète humaine (Short et Thrower, 1986). Par ailleurs, une étude menée au Canada en 1991 a démontré que plusieurs espèces de poissons vendues en filets renfermaient des niveaux faibles de <1 à 2 µg/kg alors que les mollusques vendus frais ou en cannes, contenaient des niveaux plus élevés variant de <1 à 156 µg/kg (Forsyth et Cleroux, 1991). D'autre part, une étude récente publiée en 1999 témoigne du fait que les résidus tributylétains contenus dans les produits marins vendus commercialement en Asie, Amérique du Nord, Europe et Australie étaient en moyenne de 185 ng/g (poids sec) (Keithly, Cardwell et Henderson, 1999).

Chez les mammifères, le système immunitaire est le plus sensible à l'action du TBT. À partir d'expositions effectués chez le rat, il a été déterminé que la dose sans effets observés (NOEL) varie entre 0.025 et 0.2 mg/kg/jour (Schweinfurth et Gunzel, 1987; United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1997). En appliquant un facteur de protection de 10 à 100, on estime que la dose journalière acceptable chez l'humain se situerait entre 0.25 à 20 µg de TBT/kg/jour. Dans l'étude de Keithly, Cardwell et Henderson (1999), en se basant sur des scénarios prenant en considération une consommation moyenne et maximale de TBT provenant d'organismes marins, il a été déterminé que les concentrations environnementales de TBT dans les organismes aquatiques ne sont pas une menace pour la santé humaine.

### **3.3 Toxicité chez les mammifères**

Plusieurs études ont été effectuées *in vivo* chez des animaux de laboratoire afin de déterminer la toxicité du TBT chez les mammifères. Différents effets toxiques ont été observés, en fonction de la dose et de la voie d'exposition, au niveau dermique, hépatique, gastro-intestinal, fœtal, embryonnaire, pulmonaire, rénal et neurologique (Boyer, 1989). Par contre, il n'a pas été clairement démontré que le TBT pouvait avoir des effets cancérigènes et mutagéniques. Le système immunitaire est de toutes les cibles du TBT, la plus sensible à son action. En effet, des effets immunotoxiques sont observés à des doses plus faibles que celles qui affectent les autres organes (Krajnc *et al.*, 1984; Boyer, 1989).

#### **3.3.1 Mécanisme d'action du TBT**

Le TBT possède relativement un faible taux d'absorption par le tractus gastro-intestinal (Boyer, 1989). Lorsqu'il est absorbé, il est métabolisé par les monooxygénases cytochrome P450 localisés dans les microsomes du foie pour former les dérivés  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -hydroxybutyldibutylétain. Les intermédiaires principaux  $\alpha$ - et  $\beta$ - sont instables et sont par la suite transformés en dérivés dibutylétains (Fish, Kimmel et Casida, 1976; Kimmel, Fish et Casida, 1977). Cependant, il faut noter que la déalkylation du TBT en DBT est incomplète et que suite à une administration orale, une

quantité potentielle cytotoxique de TBT pourra être distribuée au sein de tout l'organisme (Humpell et al., 1986; Snoeij, 1987). La structure chimique du TBT en fait un composé très réactif. Les groupements organiques périphériques confère au TBT un caractère lipophile lui permettant d'être actif au niveau des structures lipidiques comme les membranes. D'autre part, son atome métallique central lui donne un caractère ionique et la capacité d'interagir avec les protéines. Le TBT engendre ainsi une gamme d'effets biochimiques au niveau de la cellule qui sont résumés dans cette section.

### **3.3.2 Interaction avec les membranes et les protéines**

Il a été suggéré que le TBT était actif au niveau membranaire à la suite d'études démontrant la présence de rosettes d'érythrocytes autour des cellules mononucléées dans les ganglions lymphatiques à la suite d'exposition chronique au TBT, et la lyse des érythrocytes lorsque exposés à des doses  $\geq 5 \mu\text{M}$  de TBT (Gray *et al.* 1987). Des modifications irréversibles de la forme des érythrocytes humains produisant l'hémolyse de ceux-ci ont été observés suite à d'expositions *in vivo* et *in vitro* (Porvaznik *et al.*, 1986; Gray *et al.*, 1987). L'intercalation asymétrique du TBT sous forme d'agrégats dans les bicouches lipidiques serait responsable de la perturbation des membranes et du changement de forme des érythrocytes (Porvaznik *et al.*, 1986; Butterfield, Schneider, et Rangachari, 1991). Des processus de fixation des membranes plasmiques, tels que la dénaturation des protéines et les réactions croisées entre la membrane plasmique et certains complexes présents dans le cytoplasme ont également été proposés comme pouvant représenter une explication aux perturbations de la structure membranaire (Zucker *et al.*, 1988).

Les organoétains possèdent la propriété d'interagir avec les protéines membranaires et intracellulaires. Ces interactions sont basées sur la formation de liens covalents entre des molécules d'organoétains et des acides aminés (Fent, 1996). Le TBT, via son atome d'étain central chargé positivement, peut interagir avec l'histamine, l'histidine et autres acides  $\alpha$ -aminés. Il peut également interagir avec la cystéine et le glutathion via leurs groupes SH et S<sup>-</sup> respectivement (Shoukry, 1993). De plus, le TBT peut interagir avec certaines composantes du cytosquelette chez les thymocytes et chez

les neutrophiles (Marinovich *et al.*, 1990; Chow et Orrenius, 1994). Cette interaction se produirait via la modification de groupes thiols et causerait une dépolarisation rapide du contenu en microfilaments de F-actine par des mécanismes  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant ou  $\text{Ca}^{2+}$ -indépendant (Chow et Orrenius, 1994). Bien que plus de 80 % de l'actine soit dépolarisé suite à l'exposition au TBT, la structure cellulaire demeure intacte et il est suggéré que cette modification du cytosquelette soit un des mécanismes possibles menant à la dégradation de l'ADN au cours du processus de mort cellulaire.

### **3.3.3. Perturbations au niveau de la mitochondrie**

De toutes les structures cellulaires, la mitochondrie est probablement la cible privilégiée du TBT. Le TBT y engendre entre autre une inhibition de la phosphorylation oxydative, responsable de la génération d'ATP. L'inhibition de la respiration cellulaire a été observée au sein de plusieurs tissus et organismes (Aldridge, 1958, 1976; Aldridge et Street, 1964, Selwyn *et al.*, 1970). Deux modes d'action du TBT ont été décrits pour expliquer l'inhibition de la phosphorylation oxydative. Tout d'abord, le TBT pénètre dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie afin d'agir comme transporteur et catalyser les échanges  $\text{Cl}^-/\text{OH}^-$  au niveau de la membrane mitochondriale interne. Ce processus implique la formation d'une paire d'ions électroneutre entre une molécule de  $\text{Bu}_3\text{Sn}^+$  et un anion halogène  $\text{X}^-$  à l'interface aqueuse située des deux côtés de la membrane (Simchowicz *et al.*, 1991). Cette paire d'ions électroneutre pourra alors être transloquée à travers la membrane lipidique, agissant ainsi comme un ionophore. Il en résulte une inhibition du transport uniport des anions et des canaux anioniques localisés de part et d'autre de la membrane interne. Le TBT altère donc le gradient de protons essentiel à la synthèse d'ATP au sein de ces composantes. D'autre part, le second mode d'action du TBT implique une inhibition directe du complexe ATPase, résultant en une diminution de l'activité de l'ATPase et de l'ATP synthétase. Le TBT interagit avec l'élément  $\text{F}_0$  du complexe  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATPase, entraînant l'inhibition du transfert de protons.

L'une des conséquences des actions du TBT sur la mitochondrie est le gonflement exagéré de celle-ci qui entraîne une perte de la plupart de ses fonctions énergétiques. Cette perte de fonctions est associée à la diminution de la concentration des substrats et

du phosphate à l'intérieur de la mitochondrie et à l'apparition de dommages structuraux (Aldridge et Street, 1964; Aldridge, 1976). Enfin, une autre conséquence de l'action du TBT est la diminution du pH et de la concentration des anions à l'intérieur de la mitochondrie.

### **3.3.4. Altération générale de l'homéostasie ionique de la cellule**

L'action toxique des organoétains trisubstitués comme le TBT sur les membranes cellulaires entraîne des perturbations non seulement au niveau la bicouche lipidique, mais également au niveau des protéines impliquées dans le transport d'ions et de nutriments au travers des membranes. Tout d'abord, il a été démontré que le TBT engendre l'inhibition de la  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase chez le cerveau de bovin et chez les cellules cardiaques de rat, de même que la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase chez le muscle de lapin (Selwyn *et al.*, 1970). À des concentrations  $\geq 10 \mu\text{M}$ , le TBT entraîne la fermeture des pompes calciques et sodium-potassium. D'autre part, il y a également perturbation des échanges ioniques chez les poissons. En effet, une inhibition de l'activité  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase a été démontrée dans des homogénats de branchies provenant du poisson *Fundulus heteroclitus*, provoquant des problèmes d'osmorégulation (Pinkey *et al.*, 1989). Par ailleurs, des études réalisées chez la truite arc-en-ciel ont démontré que le TBT pouvait causer l'inhibition de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , affectant ainsi les réponses adrénérgiques chez celle-ci (Virkki et Nikinmaa, 1993).

Une perturbation de l'homéostasie calcique se produit à l'intérieur de la cellule suite à l'exposition au TBT. Les travaux de Aw *et al.* (1990) ont pour la première fois démontré que le TBT entraînait chez les thymocytes de rat isolés une augmentation rapide et soutenue de la concentration du calcium libre dans le cytoplasme. Un mécanisme en trois étapes a par la suite proposé par Chow *et al.* (1992) pour expliquer cette mobilisation du calcium à l'intérieur de la cellule: 1) libération du  $\text{Ca}^{2+}$  séquestré dans les réservoirs intracellulaires, 2) ouverture des canaux calciques situés sur la membrane plasmique provoquant l'entrée subséquente du  $\text{Ca}^{2+}$  présent dans le milieu extracellulaire, 3) inhibition de l'expulsion du calcium à l'extérieur de la cellule. La contribution majeure à l'élévation du calcium intracellulaire provient de l'entrée massive du calcium contenu

dans le milieu extracellulaire, démontrant que le TBT augmente la perméabilité membranaire pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$ . De plus, l'entrée du calcium se ferait via des canaux calciques spécifiques qui seraient ouvert directement par le TBT. D'autres types cellulaires, tels que les thymocytes de souris (Chikaisa et Oyama, 1992), les cellules neuronales (Oyama, 1993), les kératinocytes (Corsini *et al.*, 1997a) et les hépatocytes de truite arc-en-ciel (Reader, Marion et Denizeau, 1993) subissent également une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  suite à l'action du TBT.

### **3.3.5. Effets au niveau de la signalisation cellulaire et de l'expression génique**

L'augmentation de calcium à l'intérieur de la cellule a pour conséquence d'induire plusieurs enzymes  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes dont la calmoduline et la phospholipase  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) (Zaucke, Zöltzer et Krug, 1998). Par exemple, l'activation dose-dépendante de la  $\text{PLA}_2$  par le TBT entraîne la libération d'acide arachidonique (AA) de sa position *sn*-2 au niveau des phospholipides membranaires et une perte d'intégrité de la membrane chez les cellules promyéloïdes HL-60 (Zaucke, Zöltzer et Krug, 1998). Il a de plus été démontré que le TBT pouvait provoquer l'activation des MAP kinases. La phosphorylation de  $\text{PLA}_2$  par les MAP kinases est nécessaire afin qu'il y ait activation complète. Donc, l'élévation du calcium et l'activation des MAP kinases, deux processus indépendants engendrés par le TBT contribueraient à l'activation de la  $\text{PLA}_2$ . Outre les effets du TBT sur la phosphorylation oxydative et la déplétion des niveaux d'ATP, les études de Snoeij *et al.* (1986) ont démontré que le TBT entraînait une inhibition de la synthèse protéique, d'ADN et d'acide ribonucléique (ARN).

L'exposition du TBT au niveau dermique chez la souris entraîne la production et le relargage de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\alpha$  qui agit de façon autocrine sur sa propre production et sur celle d'IL-6 (Corsini *et al.*, 1996a). Ce type d'exposition provoque également l'augmentation de l'expression du gène du TNF- $\alpha$  qui est sous contrôle de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Corsini *et al.*, 1997b). Chez les cellules HEL30, lignée cellulaire ayant le phénotype des thymocytes, l'activation de NF- $\kappa$ B et la production d'IL-1 $\alpha$  ont également été observés (Corsini *et al.*, 1996b, 1997a). La perte de l'homéostasie de la mitochondrie et le calcium ont été

proposés comme étant responsables de l'activation de cette réponse inflammatoire chez ces cellules. Il a été démontré que l'activation de NF- $\kappa$ B était inhibée par des antioxydants et que l'inhibition fonctionnelle de la mitochondrie suite à un traitement prolongé au bromure d'éthidium réduit de façon substantielle l'activité de NF- $\kappa$ B et la production d'IL-1 $\alpha$  (Corsini *et al.*, 1996b, 1997a). La production de ROS originant de la chaîne respiratoire dans la mitochondrie suite à l'action du TBT serait responsable de l'activation de NF- $\kappa$ B. De plus, le fait que la roténone, un inhibiteur de l'entrée d'électrons dans le complexe I de l'ubiquinone, inhibe complètement l'activation de NF- $\kappa$ B, mais non de la synthèse d'IL-1 $\alpha$ , laisse supposer que le facteur de transcription AP-1, qui est aussi impliqué dans l'expression du gène de l'IL-1 $\alpha$  est également activé par le TBT (Corsini *et al.*, 1996b, 1997a). Enfin, l'activation de tous les processus mentionnés ci-haut est dépendante de l'augmentation de calcium à l'intérieur de la cellule qui est un des premiers processus engendré par le TBT (Corsini *et al.*, 1997a).

### **3.3.6 Effets au niveau du système nerveux et reproducteur**

Contrairement à ses congénères monoalkylétains, triméthylétains et triéthylétains, le TBT engendre peu d'effets au niveau du système nerveux et reproducteur *in vivo*. Des études ont démontré que le TBT n'engendrait pas de perturbations au niveau de l'hippocampe lorsqu'administré chez le rat (Barnes et Stoner, 1958). Cependant, d'autres études ont démontré que le TBT pouvait induire une accumulation d'eau dans le cerveau et la moelle épinière et une apparition d'ataxie (Krajnc *et al.*, 1984). Plus récemment, des études effectués chez le rat ont montré qu'à de fortes doses, le TBT pouvait induire une neurotoxicité qui serait causée par une inhibition de la Ca<sup>2+</sup>ATPase (Yallapragada *et al.*, 1991). L'effet du TBT sur le système nerveux a également été démontré en culture sur des astrocytes corticaux et sur des coupes organotypiques d'hippocampes. Au niveau de l'hippocampe, le TBT peut induire la mort cellulaire par apoptose qui serait médiée par une élévation intracellulaire de calcium et par une génération de radicaux libres (Mizubishi, Ikegawa et Matsuki, 2000). Le TBT induit également la mort cellulaire des astrocytes corticaux, mais plutôt causée par un stress oxydatif qui serait dépendant de certaines voies de signalisation intracellulaires (Mizubishi *et al.*, 2000).

Au niveau du système reproducteur, l'embryotoxicité potentielle du TBT résultant d'exposition *in vivo* a été démontré au niveau des bourgeons caudal (Barrach et Neubert, 1986). Cependant, alors que l'embryotoxicité du TBT en culture se produit à des concentrations faibles, *in vivo*, des doses approchant celles qui sont toxiques pour la mère sont nécessaires pour induire des effets embryotoxiques et foetotoxiques chez la souris (Davis *et al.*, 1987). Somme toute, l'exposition au TBT ne représente pas un grand danger pour le fœtus, il est grandement probable que le TBT soit métabolisé en des dérivatifs de faible toxicité lors de son passage au travers du placenta (Davis *et al.*, 1987).

### **3.4. Immunotoxicité induite par le TBT**

#### **3.4.1 Toxicité générale sur le système immunitaire**

Chez des animaux de laboratoire, il a été démontré que le TBT engendre des perturbations sélectives au niveau du cortex thymique et inhibe dans une certaine mesure la réponse immunitaire. L'administration de TBT entraîne une augmentation des niveaux d'IgM (Immunoglobulines M) et une réduction des niveaux d'IgG dans le sérum. Par ailleurs, une exposition à 7 mg/kg/jour de TBT pour une période de 6 semaines engendre une suppression de la réaction d'hypersensibilité de type retardé en réponse à l'ovalbumine et à la tuberculine et une réduction de la résistance de l'hôte face à l'infection par *Trichinella spiralis* de même qu'une diminution de l'activité des macrophages et des cellules NK (Vos *et al.*, 1984; Vos, Krajnc et Wester, 1985). Une baisse de l'activité des cellules NK au niveau des poumons a également été observé avec l'accroissement de la dose en TBT (Van Loveren *et al.*, 1990). Par ailleurs, il a été démontré que le système immunitaire des jeunes rats est plus sensible que celui des rats adultes, ceci possiblement dû aux effets nocifs du TBT lors du développement (Smialowicz *et al.*, 1989). L'étude de Vos *et al.* (1990) est celle qui a servi à établir les normes de NOEL, de la dose minimale induisant l'effet observé (LOEL), et de la dose de référence reconnu par l'USEPA en 1997. Cette étude portant sur les effets chroniques engendrés par le TBT a démontré en se basant sur plusieurs paramètres (diminution du poids du thymus, élimination de *Listeria monocytogenes*) que les valeurs de la dose sans

effets nocifs observés (NOAEL) et de la dose minimale induisant l'effet nocif observé (LOAEL) étaient respectivement de 0.5 mg/kg/jour et de 5 mg/kg/jour.

### **3.4.2 Toxicité sur les thymocytes et lymphocytes T**

Une diminution du poids du thymus, de la rate et des ganglions lymphatiques suite à l'exposition au TBT chez le rat a été premièrement rapporté par Seinen et Penninks (1979). Ces travaux ont été poursuivis par Funahashi, Iwasaki et Ide (1980) qui ont démontré que l'administration du TBT à des doses de 3 à 12 mg/kg/jour chez le rat par gavage entraîne une réduction dose-dépendante du poids du thymus allant jusqu'à 50 % après 13 semaines d'exposition. Une dose plus faible de 2 mg/kg/jour pour la même période d'exposition entraîne également une réduction du poids du thymus (Krajnc *et al.*, 1984). Au cours de la même étude, des doses de 7 mg/kg/jour et de 30 mg/kg/jour administrées durant 4 semaines ont entraîné une atrophie thymique de 35 et 85% respectivement. L'atrophie du thymus à 7 mg/kg/jour était accompagné par une diminution du nombre de lymphocytes sanguins périphériques (PBL),

Bien que plusieurs composantes du système immunitaire soient affectées par le TBT, la réponse immunitaire médié par les lymphocytes T (plus particulièrement les lymphocytes T suppresseurs CD8<sup>+</sup>) serait la principale cible du TBT (Vos et al., 1984; Smialowicz et al., 1990).

### **3.4.3 Caractérisation de l'immunotoxicité au niveau du thymus**

Comme il en a été fait mention précédemment, le TBT provoque à de faibles concentrations une diminution du nombre de thymocytes corticaux et une réduction du volume du thymus. L'observation suggérant que l'immunodéficience induite par le TBT soit attribuable à une action toxique sélective sur les lymphocytes du thymus dérive du fait que la diminution du nombre de cellules dans la rate se produit bien après la réduction du nombre de cellules dans le thymus (Vos et al. 1984). L'impact du TBT sur l'atrophie du thymus n'est pas uniquement causé par une action antiproliférative sur les thymocytes corticaux comme observé lors d'exposition au DBT, mais également par une destruction

de cellules thymiques (Boyer, 1989). L'équipe de Aw *et al.* (1990) ont été les premiers à démontrer une augmentation de la mort des thymocytes par apoptose en réponse au TBT. Cette mort cellulaire est caractérisée par des changements morphologiques tels que la condensation de la chromatine, la contraction du cytoplasme et la formation de corps apoptotique. La mort par apoptose a été attribuée à l'ouverture des canaux calciques par le TBT qui engendre une augmentation de calcium dans le cytoplasme. Cette augmentation des ions calciques est responsable de l'activation spécifique d'endonucléases impliquées dans la fragmentation de l'ADN au niveau des régions internucléosomales, un phénomène classique du processus apoptotique. Il a de plus été démontré que l'apoptose se produit selon un mécanisme indépendant de la synthèse protéique et sous des conditions où les niveaux d'ATP sont sérieusement réduits (Raffray et Cohen, 1991, 1993a).

Les premières études concernant l'induction d'apoptose par le TBT mentionnées ci-haut ont été réalisées *in vitro*. Raffray et Cohen (1993b) ont publié une autre étude dans laquelle ils exposent que l'apoptose des thymocytes pourrait également être un mécanisme par lequel le TBT induit l'atrophie du thymus *in vivo*. Ils ont démontré que 48 heures post-exposition à des doses de 30 mg/kg et 60 mg/kg de TBTO (oxyde de tributylétain), des réductions de 34 et 57 % du poids du thymus respectivement étaient accompagnées d'une augmentation de la fragmentation internucléosomale de l'ADN chez les thymocytes. De plus, ils ont montré que le DBT, le produit de déalkylation majeur du TBT, ne stimulait pas l'apoptose des thymocytes *in vitro*, démontrant que l'effet toxique du TBT n'était pas relié à l'action de son métabolite. Cependant, leurs travaux ont été critiqués par Pieters, Bol et Penninks (1994) qui mentionnent que l'augmentation réelle de fragmentation de l'ADN au sein du thymus 48 heures post-exposition ne serait que de 150 % de la valeur du groupe contrôle, soit une augmentation négligeable. Ceux-ci ont de plus démontré que l'effet antiprolifératif du DBT est médié par une inhibition sélective de la prolifération, mais non par la différenciation des thymocytes immatures CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. Il en résulte donc une réduction de la production des thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> et des thymocytes matures simple positif et une accumulation des autres types de thymocytes (Pieters *et al.*, 1994). Ces thymocytes déjà formés sont naturellement soumis à un

processus de sélection négative, donc à une mort par apoptose (Pieters, Bol et Penninks, 1994). Le TBT ayant le même effet antiprolifératif que le DBT, ces chercheurs mettent en doute le fait que l'atrophie du thymus en réponse au TBT ne soit qu'uniquement le résultat d'une induction d'apoptose. Ils suggèrent plutôt que ce phénomène se produirait selon un mécanisme antiprolifératif spécifique comme c'est le cas du DBT.

D'autre part, en utilisant des doses antiprolifératives de DBT et TBT *in vivo*, Gennari *et al.* (1997) ont démontré que l'apoptose ne serait pas impliquée dans le processus d'atrophie du thymus. Une absence de fragmentation de l'ADN et une absence de cellules apoptotiques libres dans les coupes histologiques de thymus ont servi de bases à cette conclusion. Ils ont de plus démontré que contrairement aux études de Aw *et al.* (1990) et Raffray et Cohen (1993b), le DBT induit l'apoptose chez les thymocytes isolés en utilisant des doses plus faibles et des temps d'expositions plus longs, indiquant que le DBT pourrait être l'élément biologiquement actif du TBT. Cette observation est appuyée par l'étude de Snoeij (1987), dans laquelle l'injection intraveineuse de TBT et de DBT à des doses antiprolifératives a été effectuée chez le rat. Ceci permet d'éviter l'effet de premier passage et la métabolisation subséquente du TBT en DBT. Les résultats ont démontré que même si le TBT est présent à de fortes concentrations dans la circulation sanguine, il n'entraîne pas d'atrophie du thymus, contrairement au DBT qui engendre une atrophie marquée du thymus suite à une telle administration intraveineuse. Toutefois, les groupes de Gennari *et al.* et de Raffray et Cohen s'entendent pour mentionner que le mécanisme par lequel se produit l'atrophie du thymus impliquerait des effets antiprolifératifs complexes et des effets apoptotiques cytotoxiques. À de faibles doses, un mécanisme antiprolifératif serait engendré alors qu'à des doses modérées à élevées, l'induction d'apoptose pourrait devenir d'une plus grande importance (Raffray et Cohen, 1998).

#### **3.4.4. Mécanisme d'induction de l'apoptose**

Récemment, le mécanisme d'induction d'apoptose par le TBT a fait l'objet de plusieurs études sur des lignées de cellules immortelles. Il a été démontré que le TBT induisait l'apoptose chez les cellules promyéloïdes HL-60 (Zaucke, Zöltzer et Krug,

1998), les lignées de lymphocytes T Jurkat et HUT-78 (Stridh *et al.*, 1998; Stridh, Orrenius et Hampton, 1999a) et chez une variété de lignées de lymphocytes T et B (Thompson *et al.*, 1996). De plus, le TBT induit l'apoptose chez les lignées de cellules neuronales PC12 (Viviani *et al.*, 1995), les fibroblastes NIH-3T3, les cellules gliomales HTB-14 et les cellules rénales TC-7 (Thompson *et al.*, 1996). De faibles doses de TBT variant de 0.5  $\mu\text{M}$  à 2  $\mu\text{M}$  provoquent une induction d'apoptose alors que des concentrations plus fortes engendrent un processus de nécrose qui est caractérisé par une mort cellulaire en absence d'homéostasie (Zaucke, Zöltzer et Krug, 1998; Stridh *et al.*, 1999a). À de faibles doses, il a été proposé que le TBT n'est pas lui-même cytotoxique mais qu'il exerce ses effets par l'activation du programme de mort cellulaire par apoptose.

Il a été démontré que l'exposition au TBT provoque certaines des perturbations classiques du processus d'apoptose, dont la dissipation rapide du potentiel membranaire mitochondrial, la libération du cytochrome c dans le cytoplasme et l'activation de la caspase-3 (Stridh *et al.*, 1998). Le traitement de cellules lymphoïdes Jurkat avec une dose de 2  $\mu\text{M}$  de TBT entraîne la réduction du potentiel membranaire de la mitochondrie après 5 minutes d'exposition de façon concomitante avec la libération de cytochrome c dans le cytoplasme. L'activation de la caspase-3 est détectée 60 minutes après l'ajout de TBT. L'inhibition des caspases avec le peptide synthétique z-VAD-fmk n'affecte pas la libération de cytochrome c suggérant ainsi que la voie d'activation des caspases exécutrices par le TBT nécessite l'intermédiaire de la mitochondrie, de façon semblable à l'action d'autres agents toxiques tels que le paclitaxel, le peroxyde d'hydrogène et l'étoposide, et non l'activation des caspases initiatrices 2 et 8, tel que cela se produit suite à la liaison des récepteurs de mort.

D'autre part, l'inhibition de l'activité des caspases avec le peptide z-VAD-fmk prévient les changements morphologiques associés tel que la formation de blebs au niveau de la membrane plasmique et la fragmentation de l'ADN, indiquant que l'apparition de ces phénomènes est sous le contrôle des caspases exécutrices (Stridh *et al.*, 1999a). L'activation des caspases en réponse à des doses croissantes de TBT est

biphasique. Des concentrations faibles de TBT variant de 0,5 à 2  $\mu\text{M}$  entraînent une activation des caspases 30 fois supérieure à la normale, alors qu'à des doses fortes de 5 à 10  $\mu\text{M}$  causant la nécrose de la cellule, l'activité des caspases n'est que faiblement accrue par rapport à la normale. De plus, chez des cellules apoptotiques Jurkat et HUT-78 pré-traitées au CD95/Fas, il a été démontré que l'ajout de fortes concentrations de TBT réduit l'activité globale des caspases et que cet effet inhibiteur est renversé par l'ajout conjoint de dithiothréitol avec le TBT (Stridh *et al.*, 1999a). Ceci démontre que le TBT a la capacité d'interagir avec des protéines possédant des groupements thiols vicinaux et que cette interaction entraîne, lorsqu'elle est suffisante, l'inhibition des caspases exécutrices. Le TBT possède une structure se rapprochant de celle du phénylarsine oxyde, un inhibiteur indirect des caspases qui se lie et inhibe des protéines qui possèdent des groupements thiols vicinaux. Cependant, aucun autre résidu cystéine n'est situé à proximité de la cystéine du site actif de la caspase-3, et aucune paire de cystéines n'est retrouvée dans les autres régions de la caspase-3. Par conséquent, le modèle suggéré pour l'inhibition des caspases par le TBT à de fortes doses passe par une inhibition de l'ouverture des pores spécifiques au niveau de la membrane mitochondriale externe suite à la liaison du TBT sur les thiols vicinaux de ces pores, empêchant ainsi la libération des cofacteurs importants pour la formation de l'apoptosome et l'activation subséquente des caspases exécutrices (Stridh *et al.*, 1999a).

Par ailleurs, comme il a été mentionné précédemment, le TBT engendre une augmentation rapide de calcium à l'intérieur de la cellule. La mitochondrie possède une grande capacité à incorporer le calcium et peut réguler les niveaux de calcium en séquestrant activement celui-ci du cytoplasme (Duchen, 1999). Cette absorption massive de calcium peut toutefois entraîner des perturbations au niveau de la mitochondrie menant à l'ouverture des pores et à la dépolarisation (Hirsch *et al.*, 1998). L'équipe de Stridh *et al.* (1999b) ont démontré que bien que l'augmentation de calcium à l'intérieur de la cellule précède la réduction du potentiel membranaire mitochondrial, elle n'est pas responsable de la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial et de la libération du cytochrome c. Ces phénomènes sont plutôt causés par une action directe du TBT sur la mitochondrie. Cependant, cette augmentation de calcium serait nécessaire à l'activation

des caspases exécutrices impliquées dans l'exécution des événements finals du processus apoptotique mais ce rôle demeure à être éclairci (Stridh *et al.*, 1999b).

Enfin, des études ont été effectuées concernant le rôle du maintien des niveaux d'ATP lors de l'induction d'apoptose par le TBT. La substitution du glucose par du pyruvate dans le milieu d'incubation, ayant pour effet de réduire les niveaux d'ATP produits par la mitochondrie a pour effet de retarder dans le temps la dissipation du potentiel mitochondrial, la libération de cytochrome c (Stridh *et al.*, 1999b). Le type de mort cellulaire en absence d'ATP est nécrotique alors qu'il est de type apoptotique lorsque les niveaux d'ATP sont maintenus par l'ajout de glucose (Stridh *et al.*, 1999c). La production d'ATP par la mitochondrie est nécessaire à deux niveaux lors de l'induction d'apoptose par le TBT. Le maintien des niveaux d'ATP accélère la réduction du potentiel mitochondrial et la libération de cytochrome c. L'inhibition de l'échangeur mitochondrial ANT par l'acide bongkrekiac résulte en un retardement de la réduction du potentiel mitochondrial tout comme lors de l'absence d'ATP. Ce composant est donc impliqué dans la dépolarisation de la mitochondrie et son activité favorise le passage des protéines intermembranaires lors de l'induction d'apoptose par le TBT. Ensuite, la présence d'ATP est essentielle à l'activation des caspases (Stridh *et al.*, 1999c). La formation de l'apoptosome, initiant la cascade des caspases post-mitochondriales, nécessite la présence d'ATP. L'absence d'ATP compromet sérieusement la possibilité de former ce complexe et d'activer les caspases. La présence d'ATP détermine donc le mode de mort cellulaire induit par le TBT autant au niveau de la mitochondrie que de l'activation des caspases.

**SECTION 2**

**Unexpected involvement of the CD45 in the apoptosis induced by mitochondrial  
perturbating agents**

Philippe Desharnais and Jacques Bernier

*Journal of Biological Chemistry (accepté sous condition)*

*Manuscrit MO: 09360*

## RÉSUMÉ

La mort cellulaire par apoptose est principalement induite chez les cellules du système immunitaire suite à la liaison des récepteurs de mort à la surface de la cellule ou en réponse à l'action de certains agents toxiques au niveau de la mitochondrie. Cette étude a été entreprise en ayant pour but de déterminer le rôle du CD45 dans le processus d'apoptose induit par des agents toxiques affectant l'homéostasie de la mitochondrie. Il a été déterminé que contrairement aux lignées de lymphocytes T normales, les lignées de lymphocytes T déficientes pour l'expression du CD45 sont résistantes au processus de fragmentation de l'ADN et de condensation de la chromatine en réponse au TBT et au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La transfection du CD45 chez des cellules déficientes restaure la sensibilité de celles-ci à la dégradation nucléaire suite à l'exposition au TBT, démontrant ainsi la spécificité du CD45. Par ailleurs, autant chez les cellules CD45-positives que CD45-négatives, l'exposition au TBT entraîne une augmentation de la mobilisation du calcium à l'intérieur de la cellule, la dégradation de IκB-α, la réduction du potentiel membranaire mitochondrial, la libération du cytochrome c de la mitochondrie, l'activation de la caspase-3 et la dégradation du DFF45. De plus, il a été démontré que la fragmentation de l'ADN pouvait être induite chez des lignées de cellules déficientes pour l'expression des tyrosine kinases p56lck et ZAP-70 et de la tyrosine phosphatase SHP-1. Ces résultats démontrent pour la première fois que l'expression du CD45 joue un rôle clé dans les processus de fragmentation internucléosomale de l'ADN et de condensation de la chromatine lors de l'apoptose. L'implication de cette phosphatase ou certains de ses substrats au cours de ces processus semblerait localisé au niveau du cytoplasme en aval de l'activation de la caspase-3.

**ABSTRACT**

Apoptosis can be initiated in immune cells by two principal pathways, which include the triggering of cell surface death receptors and chemical agents. The aim of this study was to determine the role of CD45 in chemical-induced apoptosis by agents that perturb mitochondrial homeostasis. In contrast to wild type CD45 positive T cells, the CD45-deficient T cell lines are resistant to the induction of DNA fragmentation and chromatin condensation following tributyltin (TBT) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure. CD45 transfection in deficient cell lines led to the restoration of chromatin condensation and DNA fragmentation following TBT exposure. In both CD45 positive and negative T cell lines, TBT exposition mediates intracellular calcium mobilization, degradation of the NF- $\kappa$ B regulatory subunit I $\kappa$ B- $\alpha$ , reduces mitochondrial membrane potential, cytochrome c release from mitochondria, caspase-3 activation and DFF45 cleavage. Moreover, DNA fragmentation was also induced by TBT in cells deficient for the expression of p56lck, ZAP-70 and SHP-1. Together, these results demonstrate, for the first time, that the CD45 expression plays a key role in internucleosomal DNA fragmentation and chromatin condensation processes during apoptosis. Furthermore, the role of this phosphatase, or its substrates, appears to be located in the cytoplasm downstream caspase-3 activation.

## INTRODUCTION

Apoptosis or programmed cell death (PCD) is a common cell death mechanism involved in the homeostasis and development of organisms for the elimination of damaged, infected, dangerous or useless cells. This type of cell death is a highly regulated physiological process, involving several biochemical pathways including kinases, phosphatases and proteolytic enzymes (1). Perturbing the apoptotic process plays an important role in many pathological disorders such as cancer, neurodegenerative diseases, viral infections and autoimmunity (2, 3). Apoptosis is characterized by a series of morphological and biochemical features such as volume reduction, membrane blebbing, chromatin condensation, degradation in high molecular weight DNA and oligonucleosomal fragments (1). These changes are regulated by a family of cysteine aspartate proteases called caspases (reviewed in 4-7).

The activation of caspases can be initiated by two principal pathways, which include the triggering of the cell surface death receptors and exposure to environmental chemicals. The former involves receptors of the tumor necrosis factor family (TNFR) which consists of TNFR1, Fas, death receptor 3 (DR3), DR4 and DR5. For example, the triggering of the Fas receptor by its ligand induces the trimerization of this receptor, facilitating the recruitment of the adaptor molecule Fas-associated death domain protein (FADD) (8, 9). Homotypic interactions of FADD's N-terminal death effector domain (DED) allows the binding of procaspase-8, resulting in its autoactivation (10-14) and in the initiation of the caspase cascade by processing effector caspases-3, -6 and -7 (15-17). Apoptosis can also be induced by environmental insult or cellular stress including genotoxic damage, anti-neoplastic drugs and chemicals present in the environment. Generally, cell death prompted by toxic or pharmacologic agents can take two forms; low doses of chemicals or injuries of lesser amplitude induces apoptosis while higher doses of chemicals cause necrosis (18, 19). In contrast to the degenerative changes involved during necrosis, chemical-induced apoptosis occurs in a more controlled manner. Chemically-triggered apoptosis is directly associated with the mitochondrial dysfunction which leads to the leaking of cytochrome c and the apoptosis-inducing factor (AIF) into the cytosol

(20-23). The released cytochrome c binds to Apaf-1, allowing the recruitment of procaspase-9 (24,25). Oligomerization of procaspase-9 to Apaf-1 leads to its activation, in return the activated caspase-9 induces the caspase cascade that is responsible for the irreversible commitment to cell death.

Several lines of evidence implicate kinases and phosphatases in the regulation of apoptotic cell death (26-28). Among them, the role of serine/threonine phosphorylation events are better understood than the role of tyrosine phosphorylation (26). One essential molecule implicated in the tyrosine kinase pathway in lymphoid cells is the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 (29). CD45 plays a stimulatory role in regulating TCR-mediated signalling pathways (29). In the absence of CD45 expression in T cells, TCR is uncoupled from signalling pathways, therefore the cells remains refractory to antigenic stimulation (30). The involvement of this phosphatase in apoptosis has been pointed out in several studies showing that the ligation of the CD45 in thymocytes, B-, T-cells or in eosinophils with specific antibodies increases or induces apoptosis of these cells (31-33). The same results were also observed after exposing T cells to the natural ligand of CD45, galectin-1 (34). It has also been demonstrated that Fas receptor induced-apoptosis is independent of this phosphatase (35). Interestingly, CD45-mediated apoptosis after its crosslinking did not lead to DNA degradation (31, 33).

Based on these observations, the aim of this study was to determine the importance of CD45 in chemically-induced apoptosis. The resistance to apoptosis has been established as a major mechanism responsible for treatment failure after chemotherapy via the P-glycoprotein multidrug resistance pump (36). For this reason, we have addressed the role of CD45, using a well-characterized xenobiotic for its direct toxic effect on the mitochondria. Previous studies with the biocidal agent tributyltin (TBT) demonstrated that this chemical induces apoptosis at low doses although necrosis was observed at high doses (37-39). TBT is an immunotoxicant known to induce thymocyte and lymphocyte apoptosis both *in vivo* and *in vitro* (37-42). The mechanism by which TBT induces apoptosis is common to the chemical-induced apoptotic pathway. It involves mitochondrial membrane potential disruption, cytochrome c release from mitochondria,

and caspase-3 activation leading to DNA fragmentation and cell death (38-44). TBT-induced and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced apoptosis were used to determine the role of tyrosine kinase and tyrosine phosphatase pathways in apoptosis. Results presented in this study demonstrate that cells deficient for the expression of tyrosine phosphatase CD45, in contrast to the original cells, are resistant to nuclear apoptosis including DNA condensation and fragmentation. Overall, these results provide a new model of nuclear apoptosis resistance and suggest an implication for CD45 or one of its substrates in chemically-induced apoptosis in the cytoplasm, downstream of caspase-3 activation.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Reagents*—Tributyltin chloride (96% purity) was obtained from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Propidium iodide (PI), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (70%), colorimetric caspase substrate DEVD-pNA, ethidium bromide (EtBr), ethanol (EtOH), phytohemagglutinin-P (PHA), genistein, sodium orthovanadate, leupeptin, aprotinin, pepstatin A and PMSF were all obtained from Sigma-Aldrich Canada, Ltd. (Oakville, ON, Canada). Fluo3-AM, DiOC<sub>6</sub>[3] and Hoescht 33342 were purchased from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA). The antibodies anti-IκB-α (clone C-21), anti-cytochrome c (clone H-104), anti-caspase-3 (clone H-277) and anti-actin (clone I-19) were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA), while anti-DFF-45 and anti-phosphotyrosine (clone 4G10) antibodies were provided by Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). The lipid transfection reagent Lipofectamine™ was supplied by Gibco-Life Technologies (Burlington, ON, Canada). ECL+ chemiluminescent system was purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC, Canada).

*Cell Culture*— HPB-ALL T lymphoma CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cell line and HPB-ALL CD45-deficient variant (clone HPB45.01, described in 45) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Jurkat human T lymphoma CD4<sup>+</sup> cell line (clone JKF, described in 46), p56<sup>lck</sup>-deficient JCaM1 cell line (described in 47), ZAP-70-deficient P116 cell line (describe in 48), SHP-1-deficient SHP-1-C/S cell line (described in 49) and Jurkat CD45-deficient variant (clone JK6.6, described in 50) were grow in RPMI 1640 (Bio-Media Canada, Inc., Drummondville, Canada) supplemented with 10 % of heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µM 2-mercaptoethanol and 2 mg/ml G418 (Bio-Media Canada Inc.) when required.

*Cell Treatment*—Cells were washed twice in ice-cold PBS and seeded in a 24 wells microplate at 1x10<sup>6</sup> cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 0.1% BSA. The TBT stock solution (50 mM) was prepared in ethanol and did not exceed 0.1% in the culture media. Cells were exposed to increasing doses of TBT ranging from 0.1 µM to 2.0µM for

different time points (1-5h). The inhibitors genistein (50  $\mu\text{g/ml}$ ) and activated sodium orthovanadate (20 $\mu\text{M}$ ), were pre-incubated for 30 minutes prior to TBT treatment. For  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment, doses of 50 $\mu\text{M}$  to 500 $\mu\text{M}$  were tested for periods ranging from 6 to 24 hours.

*Apoptosis assessment*—The evaluation of nuclear morphological events following TBT exposure was performed by the analysis of internucleosomal DNA fragmentation, cell cycle (for  $\text{G}_1/\text{G}_0$  subdiploid peak quantification) and chromatin condensation. The evaluation of internucleosomal DNA fragmentation was performed by standard agarose gel electrophoresis as described previously (51). Briefly, treated cells ( $1 \times 10^6$ ) were washed twice in ice-cold PBS, resuspended in 20  $\mu\text{l}$  of 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5% SDS, 10 mM EDTA, 0.1 mg/ml proteinase K and incubated at 50°C for 16 hours. Proteinase K was then heat-inactivated at 70°C for 10 minutes and 10  $\mu\text{l}$  of 10mM Tris-HCl pH 7.4 containing 0.5 mg/ml of RNase was added to sample and further incubated another 2 hours at 37°C. Samples were then loaded on a 1.5% agarose gel and electrophoresed at 45 V for 2.5 hours in TBE (0.5X). The DNA ladder was stained with EtBr and visualized by UV transillumination using a Fluor S-MultImager (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Cell cycle analysis was performed according to the method previously described (52). Treated cells were washed twice prior to being resuspended at a density of  $1 \times 10^6$  cells/ml in Krishan Buffer (0.1% sodium citrate, 0.3% NP-40, 20 $\mu\text{g/ml}$  Rnase and 50 $\mu\text{g/ml}$  PI). Samples were incubated at 37°C for 30 minutes, harvested, resuspended in fresh buffer and analyzed by flow cytometry on a FACScan<sup>®</sup> (Becton Dickinson, Oakville, ON, QC, Canada). Analyses were performed using live gates to discriminate between doublets and cells exhibiting reduced DNA content corresponding to the sub  $\text{G}_1/\text{G}_0$  diploid peak which were defined as apoptotic cells. Chromatin condensation analysis was performed by Hoescht 33342 staining as previously described (53). For this purpose, treated cells ( $1 \times 10^6$ ) were resuspended in 380 $\mu\text{l}$  of EtOH 25% and 20 $\mu\text{l}$  of Hoescht 33342 (from a 112 $\mu\text{g/ml}$  solution). Nuclear morphology was analysed by fluorescence microscopy.

*Mitochondrial Membrane Potential*—The loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) was evaluated with the lipophilic cationic dye DiOC<sub>6</sub>[3] (33). After treatment, cells ( $5 \times 10^5$ ) were washed and resuspended in 500  $\mu$ l of PBS containing 40 nM of DiOC<sub>6</sub>[3]. Cells were incubated for 30 minutes at 37°C, washed once, and then resuspended in PBS and analyzed on a FACScan<sup>®</sup> flow cytometer.

*Intracellular Calcium Mobilization*—Calcium mobilization was assessed using a fluorescent probe FLUO 3-AM as an intracellular calcium concentration indicator (54). Cells were washed twice and resuspended at a density of  $1 \times 10^6$  cells/ml in HBSS 0.1% BSA without phenol red. Fluo 3-AM was added at a final concentration of 3  $\mu$ M and the cells were incubated at 37°C for 30 minutes. Four volumes of HBSS were then added and cells were further incubated another 30 minutes. Cells were washed and analyzed on a FACScan<sup>®</sup> for a period of 15 minutes following treatment with TBT. PHA lectin activation was used as a positive control.

*Preparation of cytoplasmic extracts*—Following TBT exposure for different time points, cells were harvested, washed and resuspended in extraction buffer (20 mM HEPES/KOH pH 7.0, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 250 mM sucrose, 0.2% NP-40, 1 mM PMSF and 10  $\mu$ g/ml of aprotinin, pestatin A and leupeptin). After 20 minutes of incubation on ice, cells were homogenized. Nuclei were removed by centrifugation at 1000g for 10 minutes at 4°C. The supernatants were further centrifuged at 14000g for 15 minutes at 4°C and the resulting supernatants were used as cytoplasmic extracts.

*Western blotting*—Immunoblot analysis was done on equal amounts of whole cell lysates corresponding to  $2.5 \times 10^5$  cells/lane or 50  $\mu$ g of cytosolic extracts. Proteins were loaded on a 12 or 15% SDS-polyacrylamide gel, separated and transferred onto a nitrocellulose membrane. Visualization of the bands was done by the chemiluminescence with ECL+ system.

*Caspase activity assay*—Caspase 3-like activity was evaluated by measuring the cleavage of the chromogenic substrate Ac-DEVD-pNA. Cytosolic proteins (100µg) were added to the Reaction Buffer (100 mM HEPES/KOH pH 7.4, 20% sucrose, 0.2% CHAPS, 2 mM EDTA, 5 mM DTT) containing 50 µM Ac-DEVD-pNA in a final volume of 100 µl. Samples were incubated at 37°C for 1 hour and the absorbance of the enzymatically released pNA was measured at 405 nm with a microplate reader.

*Transfection of CD45*—Transient transfections of CD45RO isoform encoded in the plasmid pSP.SRα (provided by Dr. Michel Tremblay, Laval University) was done in CD45 negative cell lines using Lipofectamine<sup>TM</sup> cationic lipid reagent according to the manufacturer's instructions. After 24 and 48 hours of incubation, cells were collected and analyzed by flow cytometry for CD45 receptor expression. On CD45 positive cell populations, a TBT exposition was performed and chromatin condensation was assessed by Hoescht 33342 staining.

## RESULTS

*The presence of CD45 is essential for the induction of nuclear apoptosis after chemical exposure*— Exposure of lymphoid cells to chemical compounds such as drugs used in chemotherapy or environmental pollutants leads to cell death by apoptosis (55). One of the well characterized environmental pollutants demonstrated to have this property is TBT (37-44). We wanted to determine in this study the possible link between a cell activation pathway related to tyrosine phosphorylation and the chemical-induction of apoptosis by TBT on lymphoid cell lines. Human T cell lines, HPB-ALL and Jurkat, were exposed to increasing concentrations of TBT for 4h and the induction of apoptosis was determined by the visualization of internucleosomal DNA fragmentation on standard agarose gel. TBT exposure caused an increase in apoptosis in both cell lines in a dose-dependent fashion (Fig. 1A). As previously reported, higher doses of TBT do not prompt DNA fragmentation since the cells are dying by necrosis at this stage (39, 41, 43). In contrast to wild-type cells, both HPB45.01 and JK6.6 cell lines are deficient for the expression of the tyrosine phosphatase, CD45, and were both resistant to the induction of internucleosomal DNA fragmentation (Fig. 1A). In order to quantify the induction of apoptosis and to confirm the lack of DNA fragmentation in CD45 deficient cells, cell cycle analysis was performed by PI labelling. As seen in figure 1B, almost 50% of the CD45<sup>+</sup> cell population were apoptotic, displaying a reduced DNA content and thus fragmented DNA, while in the CD45<sup>-</sup> cell population, there was no detectable reduction in DNA content.

High molecular weight DNA fragmentation, which produces large fragments of about 50-300 kpb that are not visible on standard agarose gel electrophoresis, is solely sufficient for the induction of chromatin condensation. To evaluate high range chromatin DNA condensation and to detect any alterations in the nuclear morphology of the CD45<sup>-</sup> cells, cells were stained with Hoescht 3334 and analyzed under fluorescent microscopy. Results show that upon TBT exposure, an important chromatin condensation induction occurs in CD45<sup>+</sup> cells accompanied by the appearance of nuclear bodies, while the CD45<sup>-</sup> cells nuclei are intact, with no noticeable morphological alterations (Fig. 1C). These results

demonstrate that, in contrast to the CD45<sup>+</sup> cells, there is a lack of nuclear apoptosis in CD45<sup>-</sup> cells in response to TBT exposure.

*CD45 negatives cells are also resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis*—To confirm that the absence of nuclear fragmentation is not an epiphenomenon only associated to TBT exposure, we induced apoptosis with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is an exogenous source of reactive oxygen species (ROS) recognized to induce apoptosis at low doses in lymphocytes (38, 55, 56). ROS generation in the mitochondria contributes to apoptosis induced by TNF- $\alpha$ , UV irradiation, ceramides and serum deprivation (55-57). The exposure of HPB-ALL CD45<sup>+</sup>, at 100 $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 18 hours cause DNA fragmentation in contrast to the CD45<sup>-</sup> cells (HPB45.01) that remain resistant to DNA fragmentation (Fig. 2). Jurkat cells are more sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> where a lower dose of 50 $\mu$ M induces DNA fragmentation in CD45<sup>+</sup> cells but not in CD45<sup>-</sup> cells. Similar results were obtained on dose-response curves performed from 0 to 500 $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on Jurkat and HPB-ALL CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> cells after 6 to 24 hours of incubation (data not shown). These results demonstrate that nuclear apoptosis resistance in CD45<sup>-</sup> cells is not restricted to TBT but can be extended to other mitochondrial perturbing agents.

*CD45 transfection in deficient cells restores the sensibility to chemically-induced nuclear apoptosis*—To determine if the tyrosine phosphatase activity of CD45 is specific in promoting nuclear apoptosis following TBT exposure, HPB45.01 cells were transiently transfected with the pSP.SR $\alpha$  plasmid encoding the CD45RO isoform. The efficiency of the transfection was determined after 48 hours by flow cytometry after staining with an anti-CD45 antibody. The mean fluorescence of mock-transfected HPB45.01 was of 3.36 as compared to transiently transfected cells in which the mean fluorescence was 7.93 with about 20% of positive cells (Fig. 3). Positive clones expressing the CD45RO were exposed to TBT and the presence of apoptotic cells was determined by Hoescht staining. Chromatin condensation and nuclear bodies were evident in transiently transfected cells exposed to TBT as compared to mock-transfected cells (Fig. 3). The presence of apoptosis was also confirmed by flow cytometric analysis (data not shown). Thus, these results confirm a role for CD45 in nuclear apoptosis induced by TBT.

*Apoptosis induction by TBT is linked to the tyrosine kinase activity*—To analyse if TBT could modulate the tyrosine kinase pathway, phosphotyrosine immunoblots were performed at different time points following TBT exposure. In CD45<sup>+</sup> cells, a rise in tyrosine phosphorylation was observed after TBT treatment (Fig. 4A). Phosphotyrosine increases early as 15 minutes post-exposure and was especially notable for a set of proteins of 110 kDa and 59-62 kDa. The absence of CD45 results in an hyperphosphorylation of its substrates, thus the initial phosphorylation background is higher in CD45<sup>-</sup> cells. There was no modulation in the tyrosine phosphorylation state of proteins induced in these cells. To confirm the importance of the tyrosine phosphorylation pathway, the effects of a tyrosine kinase inhibitor, genistein, and tyrosine phosphatase inhibitor, orthovanadate, were evaluated following TBT exposure in CD45<sup>+</sup> cells (Fig. 4B). Genistein completely inhibits the internucleosomal DNA fragmentation during TBT treatment in CD45<sup>+</sup> cells. Moreover, the tyrosine phosphatase inhibitor, while not completely inhibiting DNA fragmentation, markedly reduced DNA fragmentation following TBT exposure. Consequently, the present results suggest a direct role of tyrosine kinases or tyrosine phosphatases in nuclear apoptosis.

The CD45 phosphatase plays a crucial role in the activation of several tyrosine kinases (27). Among them, p56<sup>lck</sup> and p59<sup>lyn</sup>, two members of the src kinases family, are regulated by its activity (27). In other experiments, we have used JCAM1 and P116 cells, which are deficient in the expression of tyrosine kinases p56<sup>lck</sup> and ZAP-70 respectively, to determine if these proteins are also involved in DNA condensation and fragmentation induced by TBT. None of these cell lines were resistant to nuclear apoptosis induced by TBT exposure (Fig. 4C). Finally, to determine if other tyrosine phosphatases control the nuclear apoptosis, SHP-1c/s cells, which are negative for the cytoplasmic tyrosine phosphatase SHP-1 were treated with TBT. The protein phosphatase SHP-1 is implicated as a negative regulator of several immunoreceptors (58). As observed in the other cell lines, SHP-1/s cells undergo the apoptotic process including DNA condensation and fragmentation. Overall, these results illustrate the specificity of CD45 and exclude the

possible involvement of CD45 substrates p56<sup>lck</sup>, ZAP-70 or SHP-1 in nuclear apoptosis process.

*Intracellular Calcium mobilization is induced by TBT in CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> cells*—TBT has previously been found to induce calcium mobilization inside the cell (40, 59). This rise of intracellular calcium was proposed to be responsible of the activation of calcium-dependent endonucleases. Since the ligation of the TCR in CD45<sup>-</sup> cell lines fails to increase calcium mobilization, we wanted to determine if this defect could be linked to the absence of nuclear apoptosis. Flow cytometric analysis of intracellular calcium mobilization with the fluorescent dye Fluo 3-AM was performed after TBT exposure (Fig. 5). As anticipated, PHA stimulation of the cells induced a rapid and transient increase in calcium mobilization in CD45<sup>+</sup> cells but not in CD45<sup>-</sup> cells. Incubating the cells in the presence of TBT increases intracellular calcium to the same extent in both cell types. Lower doses of TBT (0.1 $\mu$ M) did not induce calcium mobilization while a higher dose (2.0 $\mu$ M) induces a stronger calcium liberation (data not shown). These results demonstrate that CD45 deficiency does not affect the TBT-mediated intracellular calcium mobilization and cannot explain the lack of nuclear apoptosis in the deficient cells.

*TBT treatment induces NF- $\kappa$ B regulatory subunit I $\kappa$ B- $\alpha$ 's degradation in CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> cell lines*—NF- $\kappa$ B is an essential factor implicated in cell survival under several physiological conditions (60-62). On the other hand, NF- $\kappa$ B is also one of the principal factors induced by extracellular stress stimulus, which leads to an increase of cellular oxidative activity. It was previously reported that TBT rapidly activates NF- $\kappa$ B through the generation of ROS by the mitochondria in keratinocytes (63, 64). In the cytoplasm, NF- $\kappa$ B is present in an inactive state docked to its inhibitory subunit I $\kappa$ B- $\alpha$ , which bind to the Rel region of NF- $\kappa$ B and blocks its nuclear localisation signal. Phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  targets it for subsequent ubiquitination and degradation, thus releasing NF- $\kappa$ B in its active state. To determine if the modulation of NF- $\kappa$ B activity could explain the disparate response to TBT between CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> cells, we have analyzed by immunoblotting the degradation rate of I $\kappa$ B- $\alpha$ . As shown on figure 6, I $\kappa$ B- $\alpha$ 's degradation begins 2 hours after TBT treatment and is maximal after 4 hours of treatment.

There are no significant differences in the extent of I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation between CD45 positive and CD45 negative cell lines. This suggests that NF- $\kappa$ B is activated in both wild type and deficient cells and that its action on promoting survival signaling pathways is not responsible for CD45-deficient nuclear apoptosis resistance.

*Mitochondrial membrane potential is disrupted and cytochrome c released from mitochondria in CD45 positive and CD45 negative cell lines*—TBT is known to perturb mitochondrial activity by acting as an Cl<sup>-</sup>/OH<sup>-</sup> exchanger, thereby altering the pH gradient across the mitochondrial membrane and uncoupling oxidative phosphorylation (65). Recently, studies on Jurkat lymphoma T cells have shown that TBT induces a rapid dissipation of mitochondrial membrane potential with a concomitant release of mitochondrial cytochrome c (38). To determine if the absence of CD45 activity could account for differences in the mitochondrial apoptotic pathway, mitochondrial potential and cytochrome c release were determined. Mitochondrial potential reduction could be detected 30 minutes after incubation (data not shown) before being totally dissipated 2 hours following TBT exposure in both CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> cells (Fig. 7A). This loss of  $\Delta\psi_m$  was accompanied by the release of cytochrome c into the cytoplasm (Fig. 7B). Cytochrome c was detected 60 minutes following TBT exposure in all cell lines. This suggests that mitochondrial-induced perturbations by the TBT are not impaired in CD45-deficient cells and could not account for the lack of nuclear apoptosis.

*Caspase-3 is processed and activated in CD45 positive and CD45 negative cells*—Recent studies suggest that caspases are phosphoproteins and that their proteolytic activity is regulated by their state of phosphorylation (66, 67). It is conceivable that the different phosphorylation states present in CD45<sup>-</sup> cells may perturbate the regulation of caspase-3 activity, the main effector caspase. Immunoblots of total cell lysates were performed with an antibody which recognizes both the intact 32 kDa procaspase-3 (p32) and the immunoreactive fragments of ~20 kDa (p20) and ~17 kDa (p17). In all cell lines, TBT treatment induced a cleavage of the procaspase-3 and causes the generation of activated fragments (Fig. 8A). The cleavage generally began 2 hours following exposure and procaspase-3 was almost completely processed 4 hours post-treatment. To confirm

that caspase-3 was activated, we performed an activity assay on caspase-3 like proteases using the synthetic substrate DEVD-pNA. Results in figure 8B show that caspase-3 activity is increased 2 hours after treatment and was maximal 4 hours after treatment, which is well-correlated with procaspase-3 cleavage. However, longer periods of exposition did not result in higher activity level of caspase-3 (data not shown). These results demonstrate that procaspase-3 processing and activation is not impaired by the absence of CD45 in TBT-induced apoptosis.

*DFF45 is not responsible for the lack of nuclear apoptosis in CD45 negative cells*—DNA Fragmentation Factor (DFF) is one of caspase-3's target and is implicated in nuclear disassembly. DFF is a heterodimeric protein consisting of a 40 kDa (DFF40/CAD) and a 45 kDa (DFF45/ICAD) subunit (68, 69). In the cytoplasm, DFF45 serves both as a molecular chaperone mediating the correct folding of DFF40 and as an inhibitor of DFF40 nuclease activity by forming a complex with the former (68-71). DFF45, also a substrate of caspase-3, can be cleaved to release DFF40 from its inhibitor, leading to chromosomal DNA fragmentation at internucleosomal spacers. To determine if a lack of DFF40 activation could be responsible for the absence of DNA fragmentation in CD45 negative cells, immunoblots of total cell lysates with an antibody directed against DFF45's intact form were done. As shown in figure 8C, the DFF45 subunit is cleaved in both CD45 positive and CD45 negative cells during exposure to TBT. The cleavage begins 2 hours following TBT exposure and DFF45 signal almost completely disappears after 4 hours. The cleavage rate of DFF45 follows the one of procaspase-3 as expected. Unexpectedly, we observed a lower level of DFF45 in CD45<sup>-</sup> cells as compared to CD45<sup>+</sup> cells. This decrease in DFF45 expression could partly explain the difference in the induction of nuclear apoptosis between cells and suggests that while DFF40 nuclease is activated at a certain level in the CD45 negative cells, its impaired expression is not sufficient to induce DNA fragmentation.

*The defective signal for nuclear apoptosis in CD45 negative cells is located in the cytoplasm*—Results presented above demonstrate that the caspase-3 activation and the DFF45 cleavage in CD45 negative cells did not result, as expected, in chromatin

condensation and DNA fragmentation following TBT exposure. This suggests that there is a defective signal in CD45 negative cells located downstream caspase-3 activation that prevents nuclear apoptosis. Moreover, the decreased expression level of DFF45 observed in CD45<sup>-</sup> cells may be responsible for the lack of internucleosomal DNA fragmentation. To determine if this signal originates from the cytoplasm or from the nucleus of CD45<sup>-</sup> cells, we used a cell-free system in which isolated nuclei from both CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> were incubated in the presence of their homologous non-treated and TBT-treated cytoplasmic extracts. As figure 9 illustrates, TBT-treated cytoplasmic extracts from CD45 positive cells are able to induce DNA fragmentation in both CD45 positives and CD45 negatives isolated nuclei. However, TBT-treated cytoplasmic extracts from CD45 negative cells are unable to induce DNA fragmentation in neither CD45 positive or CD45 negative isolated nuclei. These data indicate that there is a cytoplasmic defective signal downstream of caspase-3 in CD45 negative cells that is responsible for the absence of nuclear apoptosis. These results also show that the difference in the DFF45 expression cannot explain the absence of DNA fragmentation.

## DISCUSSION

Results presented in this study are, to our knowledge, the first linking the tyrosine phosphatase CD45, the induction of chromatin condensation and DNA fragmentation during apoptosis. In contrast to wild type CD45<sup>+</sup> positive cells, CD45<sup>-</sup> cell lines are resistant to the induction of DNA fragmentation and chromatin condensation following TBT exposure (Fig. 1). This process is not exclusive to TBT as demonstrated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> experiments (Fig. 2) but specific to the presence of CD45 activity, as demonstrated by the restoration of chromatin condensation morphology following the transfection of CD45 in deficient cells (Fig. 3). In both CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> cell lines, TBT exposure was shown to mediate intracellular calcium mobilization, degradation of NF- $\kappa$ B' regulatory subunit I $\kappa$ B- $\alpha$ , mitochondrial membrane potential reduction, cytochrome c release from mitochondria, caspase-3 activation and DFF45 cleavage (Figs. 5-8).

Other studies have demonstrated a link between CD45 and the induction of apoptosis. For instance, cross-linking CD45 molecule with mAbs can induce apoptosis in human peripheral T and B lymphocytes as well as the preferential apoptosis of immature CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes (31, 33). The induction of this programmed cell death is characterized by a reduction in  $\Delta\psi_m$ , a production of ROS, a loss of membrane asymmetry and PS exposure but did not lead to nuclear condensation or DNA fragmentation (31, 33). CD45 can also be ligated *in vivo* by galectin-1, which is expressed on thymic epithelial cells (34, 72). Susceptible thymocyte (CD4<sup>lo</sup>CD8<sup>lo</sup>) subpopulations to galectin-1-induced apoptosis are consistent with the thymocyte subpopulation susceptible to CD45 cross-linking with mAbs (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), demonstrating that CD45 ligation can participate in the elimination of negatively selected or unselected thymocytes by the induction of apoptosis (33, 72). The CD45-mediated apoptosis after its crosslinking in thymocyte do not lead to DNA degradation (33), a result similar to the present study in the absence of this phosphatase expression. Interestingly, it has been demonstrated that CD45 activity can be blocked after its dimerization by an inhibitory wedge (73). Thus it is possible that the lack of DNA fragmentation observed in these studies may be due to the absence of protein tyrosine phosphatase function encountered

after the ligation of this phosphatase. In another end, other studies have demonstrated that the CD45 is not necessary for Fas signalling pathway, in which apoptosis is induced with the characteristic appearance of DNA fragmentation in CD45 negatives cells (35, 74). This indicates that CD45 would be implicated in nuclear apoptosis only during mitochondria-induced apoptosis by chemical agents but not by receptor-mediated apoptosis.

Studies on the role of DFF45, which is critical for the induction of DNA fragmentation, have shown that this factor is cleaved in both cell lines (Fig. 8). These results are similar with those obtained by Kawamata *et al.* (75) demonstrating that there is a defective apoptotic signal in the cytoplasm of Raji B lymphoma cells downstream caspase-3 activation that is responsible for nuclear apoptosis resistance in response to a wide array of stimuli (75). They relate this resistance to a structural or functional defect of DFF40 after DFF45 cleavage. DFF40/CAD activation is important for the induction of DNA fragmentation and chromatin condensation, but this is not the only pathway downstream of caspase-3 activation that is responsible for the apoptotic changes in the nucleus (76). In this experiment, we have also observed lower levels of expression of DFF45 in CD45<sup>-</sup> cells as compared to CD45<sup>+</sup> cells. Experiments with DFF45 knockout mice lacking the DFF40/CAD functional activity demonstrated that resulting splenocytes and thymocytes are resistant to DNA fragmentation and that chromatin condensation is severely, although not totally inhibited (70). This observation suggests that the resistance of DNA fragmentation in CD45<sup>-</sup> cells could result from a decreased in the expression of DFF45, leading to the necessary stoichiometric difference needed to reach the essential threshold to induce DNA fragmentation activity. However, our experiments using a cell-free system showed that the defective signal in CD45<sup>-</sup> cells responsible for the lack of nuclear apoptosis is located in the cytoplasm (Fig. 9). Apoptosis cannot be induced when the cytoplasm of TBT-treated CD45<sup>-</sup> cells is put in presence of CD45<sup>+</sup> cells nuclei. Thus, since DFF45 has a nuclear localization (62), other factors upstream from DFF40's action and which contribute to nuclear disassembly could be impaired.

So far, the only link we can make between CD45's presence and nuclear apoptosis is the induction of tyrosine kinase activity. When CD45<sup>+</sup> cells are exposed to TBT, an increased in tyrosine phosphorylation is observed on several proteins (56-70-111 kDa) (Fig. 4A). This is in contrast with CD45<sup>-</sup> cells in which no such increase is detectable. Moreover, our results show that a tyrosine kinase inhibitor (genistein) could completely block DNA fragmentation, while a tyrosine phosphatase inhibitor (orthovanadate) reduces this process in CD45 positive cells (Fig. 4B), confirming the importance of the tyrosine kinases signalization pathway in TBT-mediated nuclear apoptosis.

Caspase activation leads to the selective cleavage of a wide array of substrates implicated in cellular structure, cell cycle progression, DNA metabolism and repair, signal transduction pathway, DNA fragmentation and tissue disembedding (7). Caspase activity can either cleave proteins which must be inactivated or whose functions are required to induce apoptotic cell death. As described earlier, caspases were found to be phosphorylated in vivo; a state in which their activity towards potential substrates is regulated (66, 67). Moreover, a relationship can be made between the state of phosphorylation of caspase targets and their rates of cleavage (77-79). From this point on, one hypothesis that could not be rejected is that the absence of CD45 tyrosine phosphatase activity can result in a modified phosphorylated state of a given caspase-3 substrate, thereby inhibiting its cleavage and apoptotic signalling pathway leading to nuclear apoptosis. The identity of these key targets is not yet known, but is under investigation in our laboratory. Thus, two major physiological substrates of CD45 are the src family member's tyrosine kinases: p56<sup>lck</sup> and p59<sup>lyn</sup> (80, 81). In CD45<sup>-</sup> cells, these substrates are hyperphosphorylated and these are reported to result in a decrease in their activity. CD45 has also been reported to bind with TCR  $\zeta$  chain (82), ZAP-70 (83), CD2 (84), fodrin (85) and with CD45-associated protein (86-88). Moreover, phosphorylated CD45 was found to serve as a docking protein for components of the Ras signalling pathway such as rasGAP, Grb2, mSOS and Vav in T cells (89). CD45 has also been shown to be coupled with p21<sup>ras</sup> pathway in B cells (90). We attempted to determine if other components involved in the T cell signal transduction pathway linked to CD45 activity were also essential to TBT-induced DNA fragmentation. Results demonstrated

that p56<sup>lck</sup>-, ZAP-70- and SHP-1-deficient cell lines were all sensitive to DNA fragmentation induced by TBT (Fig. 4C), but we cannot exclude the possibility that a compensatory mechanism could arise from these deficiencies.

In conclusion, the results presented in this study have demonstrated a new role for the tyrosine phosphatase CD45 in apoptosis induced by chemicals such as TBT. In contrast to wild-type cells, CD45-deficient cells are resistant to the TBT-induced nuclear apoptosis. In both cells, an active apoptotic program that leads to caspase-3 activation is turned on. Cell-free assays revealed that the defective signal is downstream from the caspase-3 activation leading to nuclear apoptosis, and that this is located in the cytoplasm of CD45-deficient cells. While there is an increase of tyrosine phosphorylation in CD45 positive cells and no increase of tyrosine phosphorylation in CD45-deficient cells following TBT exposure, it could be hypothesized that the defective signal involves phosphorylation events.

## REFERENCES

1. Afford, S., and Randhawa, S. (2000) *Apoptosis. Mol. Pathol.* **53**, 55-63.
2. Thompson, C.B. (1995) *Science.* **267**, 1456-1462.
3. Nicholson, D.W. (1996) *Nature Biotechnol.* **14**, 297-301.
4. Cohen, G.M. (1997) *Biochem. J.* **326**, 1-16.
5. Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. (1999). *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 383-424.
6. Nicholson, D.W., and Thornberry, N.A. (1997) *Trends. Biochem. Sci.* **22**, 299-306.
7. Denis, F., Rhéaume, E., Aouad, S.M., Alam, A., Sékaly, R.-P., and Cohen, L.Y. (1998) *Cell. Mol. Life. Sci.* **54**, 1005-1019.
8. Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., and Wallach, D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 7795-7798.
9. Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995) *Cell.* **81**, 505-512.
10. Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. and Wallach, D. (1995) *Cell.* **85**, 803-815.
11. Muzzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Ni, J., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., and Dixit, V.M. (1996) *Cell.* **85**, 817-827.
12. Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1997) *EMBO J.* **16**, 2794-2804.
13. Yang, X., Chang, H.Y., and Baltimore, D. (1998). Autoproteolytic activation of procaspases by oligomerization. *Mol. Cell.* **1**, 319-325.
14. Martin, D.A., Siegel, R.M., Zheng, L., and Lenardo, M.J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**(8), 4345-4349.
15. Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E.S. (1996) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **93**, 14486-14491.
16. Muzzio, M., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 2952-2956.

17. Stennicke, H.R., Jürgensmeier, J.M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B.B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H.M., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Green, D.R., Reed, J.C., Froelich, C.J., and Salvesen, G.S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 27084-27090.
18. Wyllie, A.H. (1987) *Arch. Toxicol. Suppl.* **11**, 3-10.
19. Lennon, S.V., Martin, S.J., and Cotter, T.G. (1991) *Cell Prolif.* **24**, 203-214.
20. Kharbanda, S., Pandey, P., Schofield, L., Israels, S., Roncinske, R., Yoshida, K., Bharti, A., Yuan, Z.M., Saxena, S., Weichselbaum, R., Nalin, C., and Kufe, D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 6939-6942.
21. Kim, C.N., Wang, X., Huang, Y., Ibrado, A.M., Liu, L., Fang, G., and Bhalla, K. (1997) *Cancer. Res.* **57**, 3115-3120.
22. Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1997) *Science.* **275**, 1132-1136.
23. Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.-I., Jones, D.P., and Wang, X. (1997) *Science.* **275**, 1129-1132.
24. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997) *Cell.* **91**, 479-489.
25. Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E.S. (1998) *Mol. Cell.* **1**, 949-957.
26. De Vos, J., Jourdan, M., Tarte, K., Jasmin, C., and Klein, B. (2000) *Br. J. Haematol.* **109**, 823-828.
27. Altin, J.G., and Sloan, E.K. (1997) *Immunol. Cell Biol.* **75**, 430-445.
28. Desai, D.M., Sap, J., Silvennoinen, O., Schlessinger, J., and Weiss, A. (1994) *EMBO J.* **13**, 4002-4010.
29. Macino, B., Zambon, A., Milan, G., Cabrelle, A., Ruzzene, M., Rosato, A., Mandruzzato, S., Quintieri, L., Zanovello, P., and Collavo, D. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**, 769-776.
30. Wu, M.X., Ao, Z., Hegen, M., Morimoto, C., and Schlossman, S.F. (1996) *J. Immunol.* **157**, 707-713.
31. Klaus, S.J., Sidorenko, S.P., and Clark, E.A. (1996) *J. Immunol.* **156**, 2743-2753.
32. Blaylock, M.G., Sexton, D.W., and Walsh, G.M. (1999) *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 1244-1250.

33. Lesage, S., Steff, A.M., Philippoussis, F., Page, M., Trop, S., Mateo, V., and Hugo, P. (1997) *J. Immunol.* **159**, 4762-4771.
34. Perillo, N.L., Pace, K.E., Seilhamer, J.J., and Baum, L.G. (1995) *Nature.* **378**, 736-739.
35. Latinis, K.M., and Koretzky, G.A. (1996) *Blood.* **87**, 871-875.
36. Ross, D.D. (2000) *Leukemia.* **14**, 467-473.
37. Raffray, M., and Cohen, G.M. (1991) *Arch. Toxicol.* **65**, 135-139.
38. Stridh, H., Kimland, M., Jones, D.P., Orrenius, S., and Hampton, M.B. (1998) *FEBS lett.* **429**, 351-355.
39. Zaucke, F., Zöltzer, H., and Krug, H.F. (1998) *Fresenius J. Anal. Chem.* **361**, 386-392.
40. Aw, T.Y., Nicotera, P., Manzo, L., and Orrenius, S. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **283**, 46-50.
41. Raffray, M., McCarthy, D., Snowden, R.T., and Cohen, G.M. (1993) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **119**, 122-130.
42. Viviani, B., Rossi, A.D., Chow, S.C., and Nicotera, P. (1995) *Neurotoxicology.* **16**, 19-26.
43. Stridh, H., Fava, E., Single, B., Nicotera, P., Orrenius, S., and Leist, M. (1999) *Res. Toxicol.* **12**, 874-882.
44. Reader, S., Moutardier, V., and Denizeau, F. (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* **14430**, 1-13.
45. Koretzky, G.A., Picus, J., Thomas, M.L., and Weiss, A. (1990) *Nature* **346**, 66-68.
46. McKenney, D.W., Onodera, H., Gorman, L., Mimura, T., and Rothstein, D.M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 24949-24954.
47. Straus, D.B., and Weiss, A. (1992) *Cell.* **70**, 585-593
48. Williams, B.L., Schreiber, K.L., Zhang, W., Wange, R.L., Samelson, L.E., Leibson, P.J., and Abraham, R.T. (1998) *Mol. Cell Biol.* **18**, 1388-1399
49. Plas, D.R., Johnson, R., Pingel, J.T., Matthews, R.J., Dalton, M., Roy, G., Chan, A.C., and Thomas, M.L. (1996) *Science.* **272**, 1173-1176.
50. Duplay, P., Alcover, A., Fargeas, C., Sekaly, R.P., and Branton PE (1996) *J Biol. Chem.* **271**, 17896-17902

51. Banda, N.K., Bernier, J., Kurahara, D.K., Kurrle, R., Haigwood, N., Sékaly, R. P. and Helman Finkel, T. (1992) *J. Exp. Med.* **176**, 1099-1106.
52. Dressler, L.G., and Bartow, S.A. (1989) *Sem. Diagn. Path.* **6**, 55-82.
53. Girard, D., Paquet, M.-E., Paquin, R., and Beaulieu, A.D. (1996) *Blood.* **88**, 3176-3184.
54. Bernier, J., Girard, D., Krzystyniak, K., Chevalier, G., Trottier, B., Nadeau, D., Rola-Pleszczynski, M., and Fournier, M. (1995) *Toxicology.* **99**, 135-146.
55. Martin, S.J., and Green, D.R. (1994) *Curr. Opin. Oncol.* **6**, 616-621.
56. Guénal, I., Sidoti-de Fraisse, C., Gaumer, S., and Mignotte, B. (1997) *Oncogene.* **15**, 347-360.
57. Zhang, P., Liu, B., Kang, S.W., Seo, M.S., Rhee, S.J., and Obeid, L.M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30615-30618.
58. Ulyanova, T., Blasioli, J., and Thomas, M.L. (1997) *Immunol. Res.* **16**, 101-113.
59. Chow, S.C., Kass, G.E., McCabe, M.J., Jr., and Orrenius, S. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 143-149.
60. Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V., and Karin, M. (1996) *Cell.* **87**, 565-576.
61. Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.G., and Verna, I.M. (1996) *Science.* **274**, 787-789.
62. Wang, C.Y., Mayo, M.W., and Baldwin Jr, A.S. (1996) *Science.* **274**, 784-787.
63. Corsini, E., Schubert, C., Marinovich, M., and Galli, C.L. (1996) *J. Invest. Dermatol.* **107**, 720-725)
64. Corsini, E., Viviani, B., Marinovich, M., and Galli, C.L. (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **145**, 74-81.
65. Aldridge, W.N., and Street, B.W. (1970) *Biochem. J.* **118**, 171-179.
66. Martins, L.M., Kottke, T.J., Kaufmann, S.H., and Earnshaw, W.C. (1998) *Blood.* **92**, 3042-3049.
67. Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. (1998) *Science.* **282**, 1318-1321.

68. Enari, M., Sakahira, S., Yokohama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998) *Nature*. **391**, 43-50.
69. Liu, X., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W., and Wang, X. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 8461-8466.
70. Zhang, J., Liu, X., Schere, D.C., Van Kaer, L., Wang, X., and Xu, M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 12480-12485.
71. Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998) *Nature*. **391**, 96-98.
72. Perillo, N.L., Uittenbogaart, C.H., Nguyen, J.T., and Baum, L.G. (1997) *J. Exp. Med.* **185**, 1851-1858.
73. Majeti, R., Bilwes, A.M., Noel, J.P., Hunter, T., and Weiss, A. (1998) *Science*. **279**, 88-91.
74. Schraven, B., and Peter, M.E. (1995) *FEBS Lett.* **368**, 491-494.
75. Kawamata, Y., Hirokawa, M., Kitabayashi, A., Horiuchi, T., Kuroki, J., and Miura, A.B. (1999) *Blood*. **94**, 3523-3530.
76. Samejima, K., Tone, S., Kottke, T.J., Enari, M., Sakahira, H., Cooke, C.A., Durrieu, F., Martins, L.M., Nagata, S., Kaufmann, S.H., and Earnshaw, W.C. (1998) *J. Cell. Biol.* **143**, 225-239.
77. Barkett, M., Xue, D., Horvitz, H.R., and Gilmore, T.D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 29419-29422.
78. Tang, D., Gururajan, R., and Kidd, V.J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 16601-16607.
79. Widmann, C., Gerwins, P., Lassignal Johnson, N., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2416-2429.
80. Mustelin, T., Pessa-Morikawa, T., Autero, M., Gassmann, M., Andersson, L., Gahmberg, C.G., and Burn, P. (1992) *Eur. J. Immunol.* **22**, 1173-1178.
81. Cahir McRarland, E.D., Hurley, T.R., Pingel, J.T., Sefton, B.M., Shaw, A., and Thomas, M.L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 1402-1406.
82. Fukurama, T., Itoh, M., Krueger, N.X., Streuli, M., and Saito, H. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 10928-10932.
83. Mustelin, T., Williams, S., Tailor, P., Couture, C., Zenner, G., Burn, P., Ashwell, J.D., and Altman, A. (1995) *Eur. J. Immunol.* **25**, 942-946.
84. Schraven, B., Samstag, Y., Altevogt, P., and Meuer, S.C. (1990) *Nature*. **345**, 71-74.

85. Lockeshwar, V.B., and Bourguignon, Y.M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 21551-21557.
86. Takeda, A., Maizel, A., Kitamura, K., Ohta, T., and Kimura, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 2357-2360.
87. Schraven, B., Schirren, A., Kirchgessner, H., Siebert, B., and Meuer, S.C. (1992) *Eur. J. Immunol.* **22**, 1857-1863.
88. Schraven, B., Schoenhaut, D., Bruyns, E., Koretzky, G., Eckerskorn, C., Wallich, R., Kirchgessner, H., Sakorafas, P., Labkovsky, B., Ratnofsky, S., and Meuer, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 29102-29111.
89. Lee, J.M., Fournel, M., Veillette, A., and Branton, P.E. (1996) *Oncogene.* **12**, 253-263.
90. Pao, L.I., Bedzyk, W.D., Persin, C., and Cambier, J.C. (1997) *J. Immunol.* **158**, 1116-1124.

**Figure 1 : Chemical-induced DNA fragmentation and chromatin condensation in CD45 positive but not in CD45 negatives cells lines.** A) Cells were treated with increasing doses of TBT or vehicle alone (EtOH: 0.1%) for 4 hours at 37°C. DNA was extracted and internucleosomal cleavage visualized on a 1.5% agarose gel. B) Cells were treated with TBT (HPB-ALL:0.8 $\mu$ M) or Jurkat (0.4 $\mu$ M) for different time points, labelled with PI and analyzed by flow cytometry. Cells exhibiting a reduced DNA content (sub diploid G0/G1 peak) were classified as apoptotic. C) TBT-treated cells as describe in b) were stained with Hoescht 33342 and chromatine condensation and DNA fragmentation determined under a fluorescence microscope. Results shown are representative of about 10 fields.

**Figure 2 : Resistance of CD45-deficient cells to hydrogen peroxide-induced apoptosis.** Cells were exposed to varying concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 18 hours at 37°C. After PI labelling, cells were analysed by flow cytometry and the apoptotic cells percentage were identified as cells population exhibiting reduced DNA content. Data are representative of at least three independent experiments.

**Figure 3: Transfection of CD45 in deficient cells restore the sensibility to chemical-induced nuclear apoptosis.** HPB-ALL CD45<sup>-</sup> cells were transfected with CD45RO. Transfected cells were analysed by flow cytometry to evaluate the level expression for CD45 in a given cell population. Positive transfected cells were then exposed to TBT and nuclear morphology assessed with Hoescht 3342 staining as described earlier. A) Mock-transfected CD45-deficient cells. B) Transfected CD45-deficient cells. Arrows indicate the apoptotic cells. C) Scattergram of CD45 expression in transfected cells.

**Figure 4: Tyrosine kinases and tyrosine phosphatases are implicated in TBT-induced apoptosis independently of p56<sup>lck</sup>, ZAP-70 and SHP-1 expression.** A) Cells were exposed to 0.8  $\mu$ M of TBT for 0 to 20 min. Whole cell lysates (2.5x10<sup>5</sup>/lane) were separated on a 12% SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-phosphotyrosine antibody (4G10). +: Indicated the positive control ( PHA stimulation for 2 min.). B) Jurkat and HPB-ALL wild type cells (CD45<sup>+</sup>) were pre-treated for 30 minutes in presence of

genistein (50  $\mu\text{g/ml}$ ) or 20  $\mu\text{M}$  of activated sodium orthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) before treatment with TBT at the indicated doses. DNA was extracted and visualized on a 1.5% agarose gel. V : vehicle, 0.1% EtOH. C) Jurkat deficient cells lines for p56lck (JCAM1), ZAP-70 (P116) and SHP-1 (SHP-1c/s) were incubated with increasing doses of TBT for 4 hours. DNA was extracted and analyzed for internucleosomal DNA fragments by electrophoresis on a 1.5% agarose gel.

**Figure 5: Inhibition of nuclear apoptosis were not related to intracellular calcium mobilization induced by TBT in CD45<sup>-</sup> cell lines.** Cells were stained with 3 $\mu\text{M}$  Fluo 3-AM and calcium mobilization analyzed by flow cytometry for a period of 15 minutes after addition of PHA or TBT. Arrows indicate the moment the agents were added to the cells.

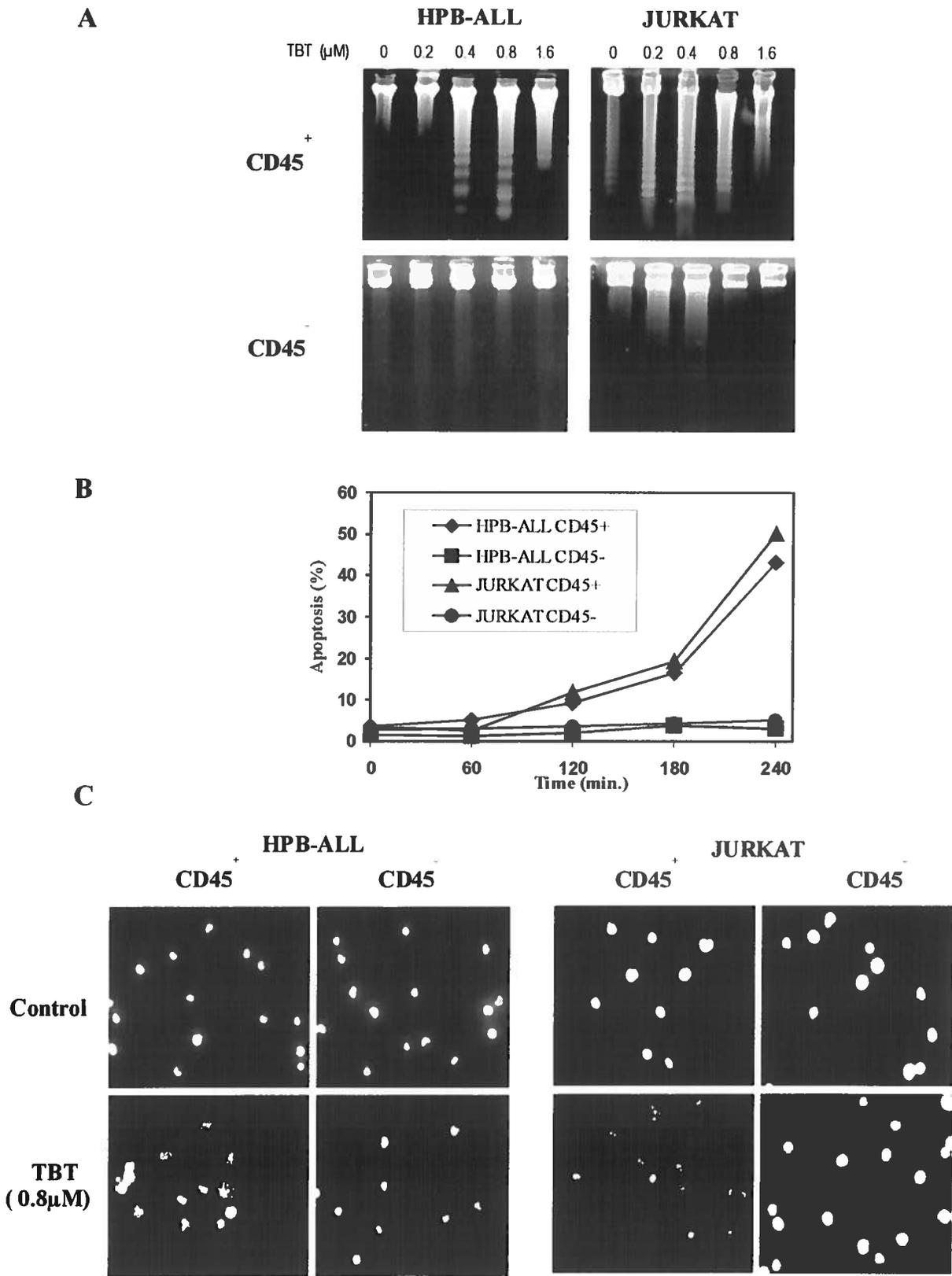
**Figure 6: TBT-mediated degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$  in CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> cell lines.** CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> cells were treated for 0 to 240 min to TBT (HPB-ALL, 0.8 $\mu\text{M}$ ; Jurkat, 0.4 $\mu\text{M}$ ). Whole cell lysates were separated on a 12% SDS-PAGE and immunoblotted with anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  antibody. Actin was used to standardize protein loading.

**Figure 7: Mitochondrial membrane potential is disrupted and cytochrome c is released from mitochondria in both CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> cell lines during TBT exposure.** A) Cells were treated for 2 hours with TBT (HPB-ALL, 0.8 $\mu\text{M}$ ; Jurkat, 0.4 $\mu\text{M}$ ), stained with fluorescent probe DiOC6 (20nM) and then analyzed by flow cytometry. The line represents vehicle-treated cells and bold lines represent TBT-treated cells. Data presented are representatives of four independent experiments. B) Cytoplasmic extracts (50 $\mu\text{g}$ ) were prepared after TBT exposure (HPB-ALL, 0.8 $\mu\text{M}$ ; Jurkat, 0.4 $\mu\text{M}$ ) as the indicated times. Proteins were separated by 15% SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-cytochrome c antibody. Actin was used as a protein loading control.

**Figure 8: Caspase 3 is activated and cleaved the DFF40 endonuclease inhibitor DFF45 in CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> cell lines following TBT exposure.** A) Cells were treated for 0 to 240 min with TBT (HPB-ALL, 0.8 $\mu\text{M}$ ; Jurkat, 0.4 $\mu\text{M}$ ). Whole cell lysates were

then separated on a 15% SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-caspase-3 antibody. B) Cytoplasmic extracts (100 $\mu$ g) were prepared after TBT exposition as describe in A). The hydrolysis of the synthetic substrate Ac-DEVD-pNA (50 $\mu$ M) was then analysed on these samples by measuring the absorbance at 405 nm on a microplate reader. C) Cells were treated with TBT for 0 to 240 min, separated by 12% SDS-PAGE and immunoblotted with an ant-DFF45 antibody. Actin was used as a protein loading control.

**Figure 9: Induction of DNA fragmentation in isolated nuclei by cytoplasmic extracts of TBT-treated cells.** HPB-ALL CD45 positive and CD45 negative cells were treated with 0.8 $\mu$ M of TBT for the indicated times. Cytoplasmics extracts (final concentration of 2 mg/ml) of treated and untreated cells were incubated for 2 hours with isolated nuclei ( $5 \times 10^5$ ) in presence of an ATP regenerating cocktail. After incubation, nuclei were harvested and labelled with PI for cell cycle analysis.



**Figure 1**

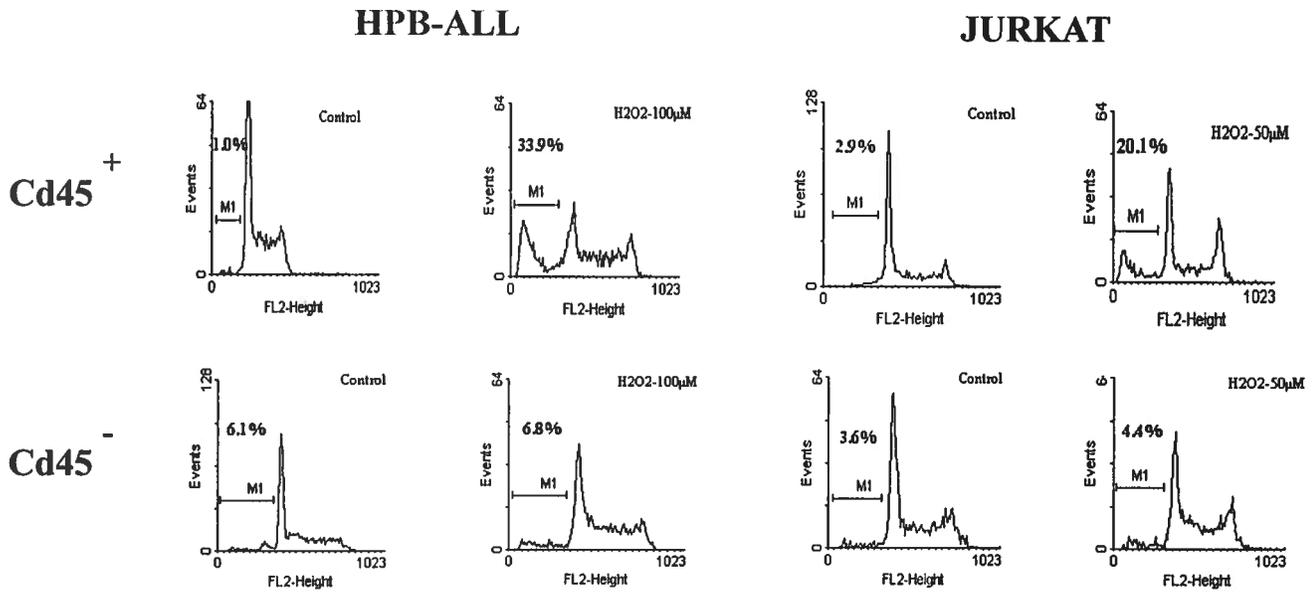
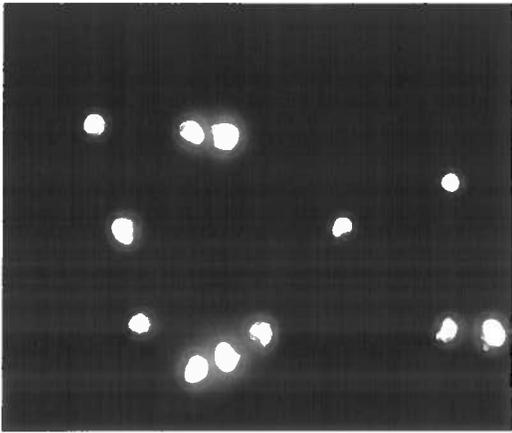


Figure 2

A



B

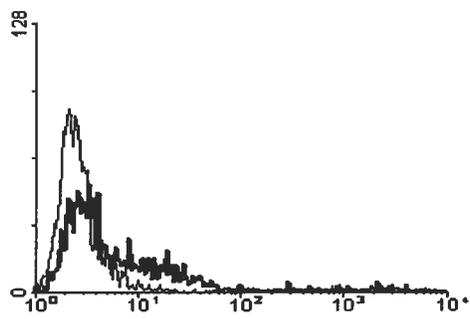
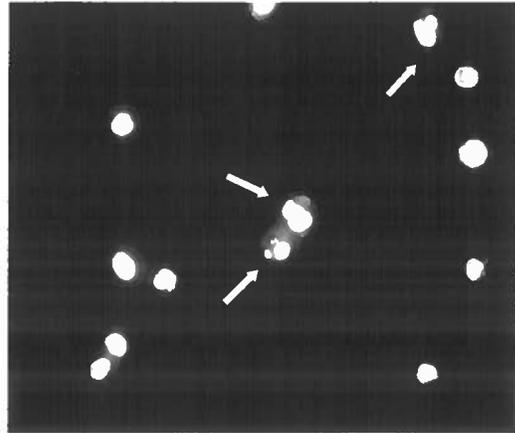


Figure 3

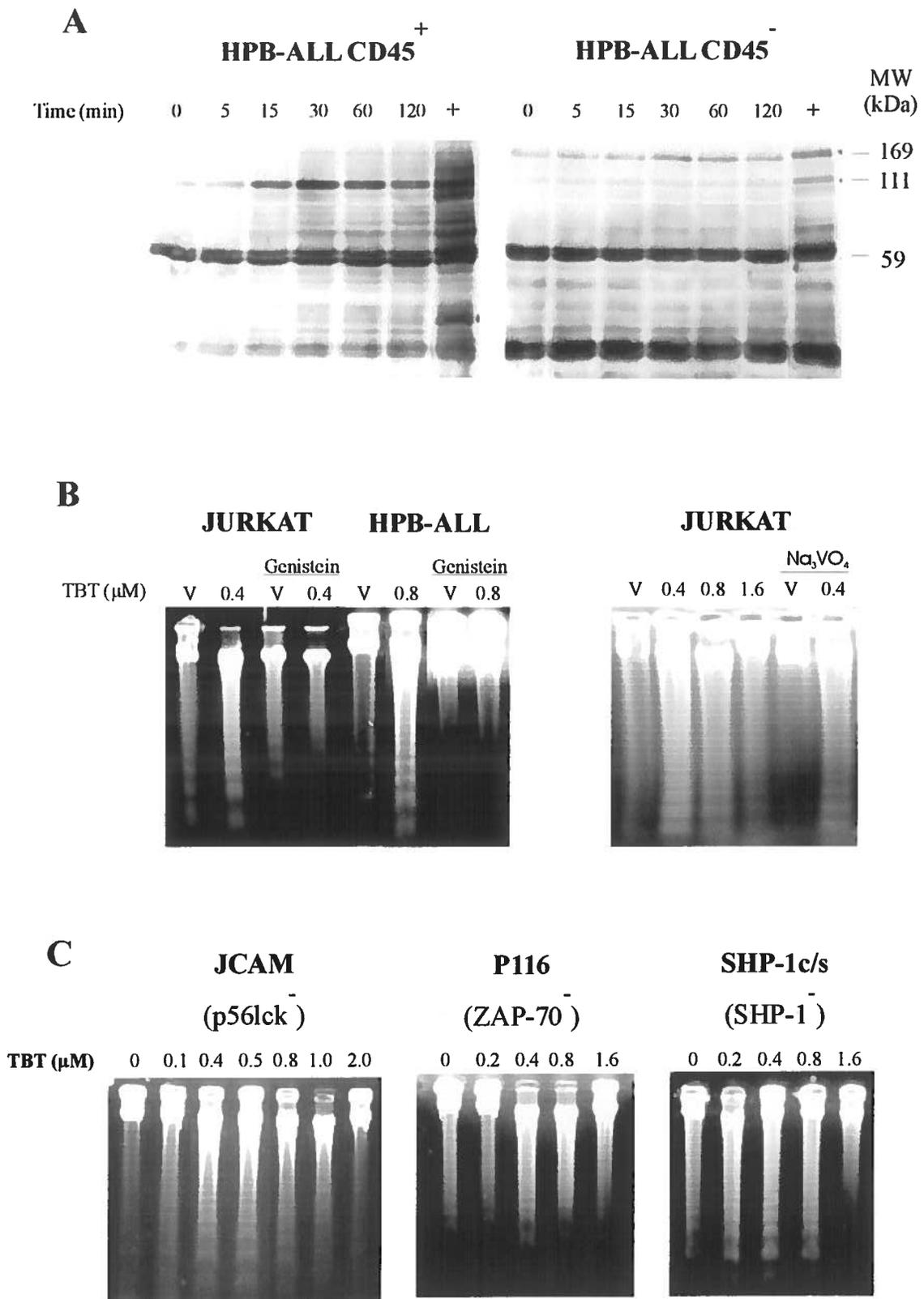
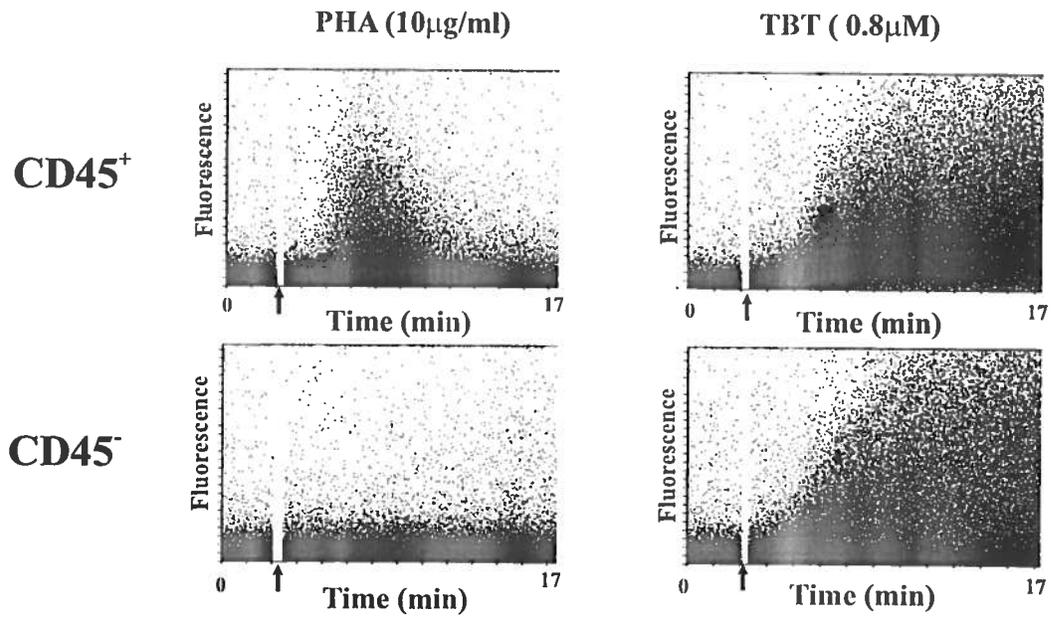


Figure 4

## HPB-ALL



## JURKAT

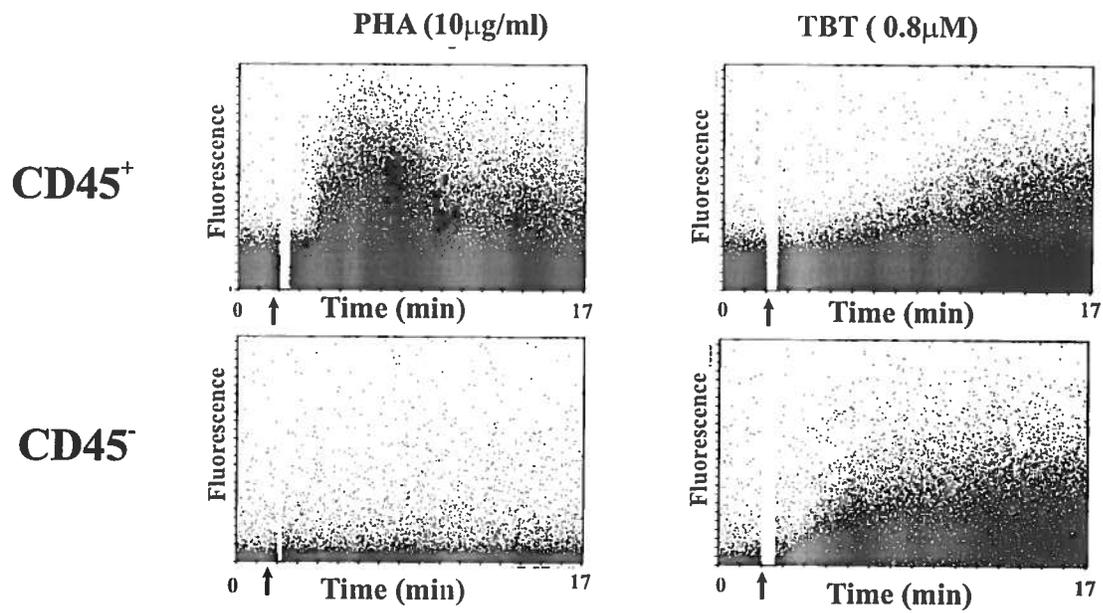


Figure 5

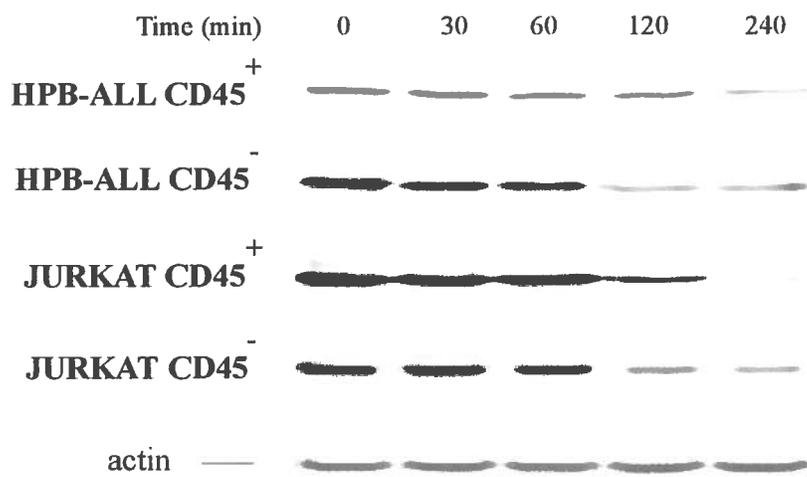
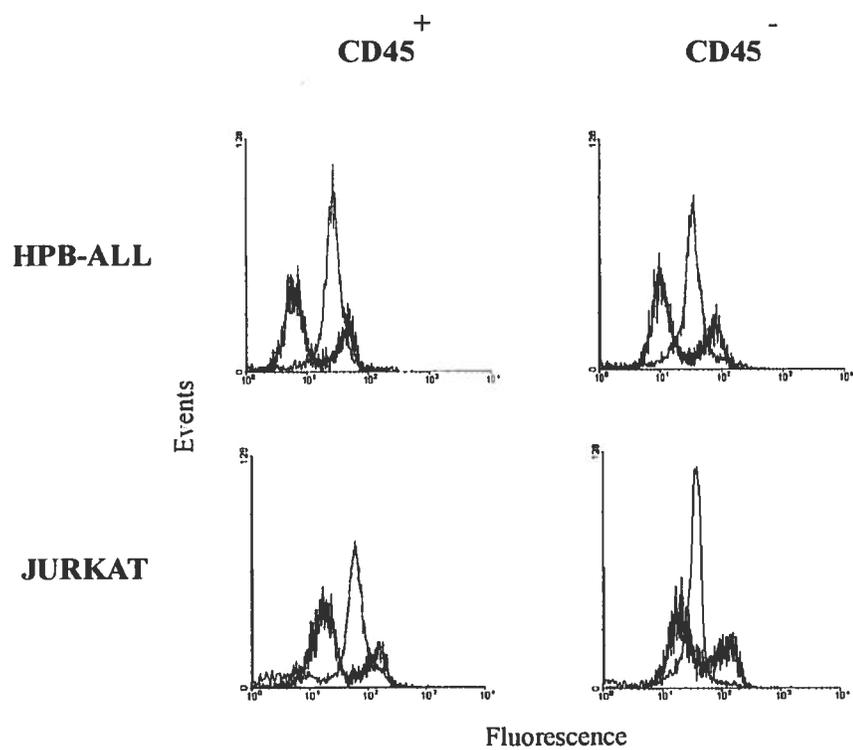
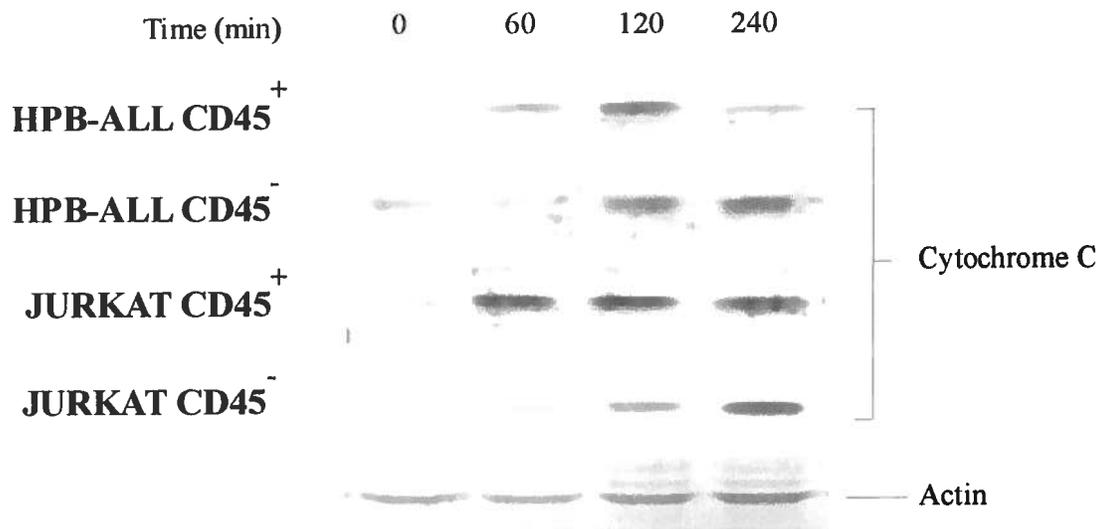


Figure 6

**A**



**B**



**Figure 7**

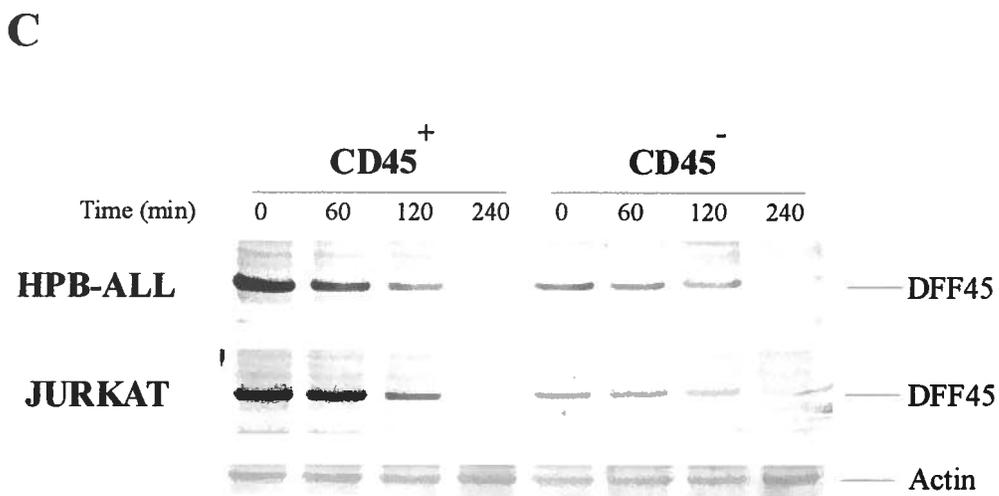
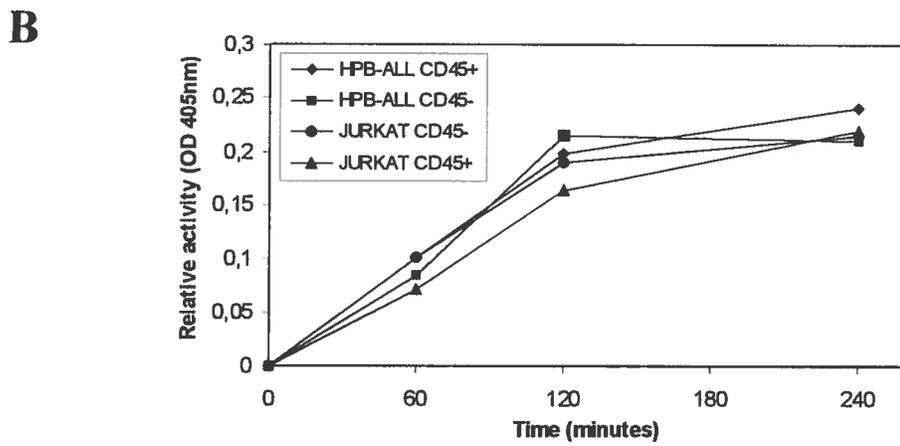
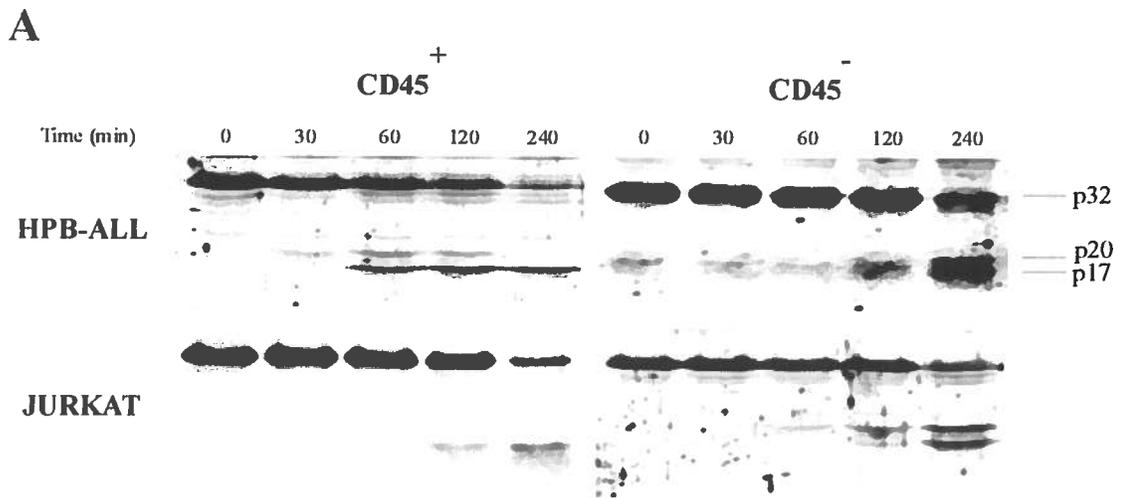


Figure 8

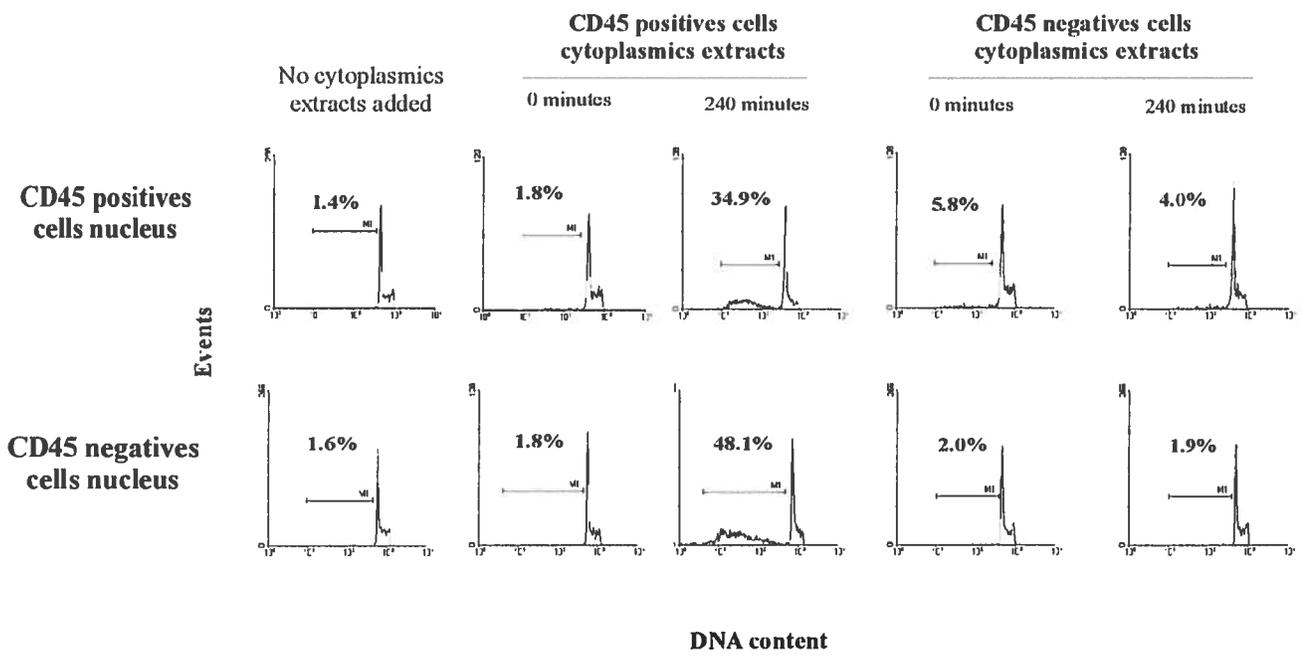


Figure 9

## CONCLUSION

Le premier objectif poursuivi au cours de ce projet de recherche était de déterminer si la tyrosine phosphatase transmembranaire CD45 avait un rôle à jouer dans le processus d'induction d'apoptose par le TBT chez les cellules du système immunitaire. L'ensemble des résultats obtenus permet clairement de démontrer que le CD45 est impliqué dans ce processus. Il a été déterminé que la présence du CD45 est essentielle à l'apparition de la fragmentation internucléosomale de l'ADN et la condensation de la chromatine, deux changements morphologiques nucléaires finaux de la cascade apoptotique. De plus, il a été démontré que le CD45 a un rôle spécifique à jouer au cours de ce processus car la seule induction de l'expression du CD45 chez les cellules déficientes sensibilise celles-ci au phénomène de fragmentation de l'ADN en réponse au TBT. L'autre objectif de ce projet était de déterminer à quel niveau de la cascade apoptotique, l'activité du CD45 ou d'un de ses substrats joue un rôle clé dans le programme apoptotique induit par le TBT. L'analyse des principales perturbations cellulaires engendrées lors de l'apoptose et des principaux événements cytotoxiques causés par le TBT a permis de cibler un niveau potentiel d'implication du CD45. En effet, en réponse au TBT, il est provoqué chez les cellules CD45 positives et CD45 négatives la mobilisation du calcium à l'intérieur de la cellule, le clivage de  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ , la sous-unité régulatrice du facteur de transcription  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , la réduction du potentiel membranaire mitochondrial, la libération du cytochrome c dans le cytoplasme, l'activation de la caspase-3 et le clivage de DFF45/ICAD, l'inhibiteur de l'endonucléase DFF40/CAD. De plus, il a été démontré que le signal défectif responsable de l'absence d'apoptose nucléaire chez les cellules CD45 négatives est localisé au niveau du cytoplasme. Celui-ci pourrait impliquer l'activation des tyrosines kinases chez les cellules CD45 positives (absente chez les cellules CD45 négatives) qui permettrait ensuite l'induction de la fragmentation de l'ADN et de la condensation de la chromatine.

Aucune autre étude répertoriée dans la littérature n'avait fait précédemment la relation entre l'expression du CD45 et l'induction d'apoptose nucléaire. Les seules études ayant démontré une implication du CD45 dans l'apoptose proviennent de la liaison

extracellulaire de celui-ci par des anticorps monoclonaux ou par son ligand naturel, la galectine-1. On note alors une susceptibilité particulière de la sous-population de thymocytes immatures  $CD4^+CD8^+$  à l'induction d'apoptose. Ce type d'apoptose est caractérisé par une réduction du potentiel mitochondrial, la production de ROS, une exposition des phosphatidylsérines à l'extérieur de la cellule et une asymétrie de la membrane plasmique mais sans l'apparition de condensation nucléaire et de fragmentation de l'ADN. Cependant, ces études ne permettent pas d'éclaircir le rôle de l'activité tyrosine phosphatase du CD45 dans ce processus. Il est même possible que l'activité phosphatase du CD45 soit inhibée lors de la ligation du CD45 dans ces études, car il a été démontré que la liaison du domaine extracellulaire du CD45 entraînait sa dimérisation, qui entraîne comme conséquence l'association et l'inhibition des domaines phosphatases du CD45. Il est possible que l'absence d'apoptose nucléaire sous ces conditions soit le résultat de l'absence de l'activité du CD45, tout comme il est observé dans notre modèle avec le TBT.

La résistance à l'apoptose nucléaire chez les cellules CD45 négatives n'est pas restreinte au TBT. Nous avons également démontré que le même phénomène pouvait être observé avec le peroxyde d'hydrogène, un inducteur bien connu d'apoptose qui affecte directement l'intégrité du potentiel membranaire mitochondrial. L'utilisation d'une plus grande variété de stimuli pourrait permettre de porter une conclusion plus définitive mais il apparaît que l'activité du CD45 est essentielle au processus d'apoptose nucléaire en réponse à des agents chimiques induisant l'apoptose via la voie de la mitochondrie. Des études précédentes ont fait mention que le CD45 n'était pas nécessaire lors de l'induction d'apoptose par la voie des récepteurs de mort suite à la liaison de CD95/Fas, le processus d'apoptose se déroulant normalement chez des cellules déficientes pour l'expression du CD45. Cependant, dans ces études le type de cellules CD45 déficientes utilisé est la lignée de lymphocytes T Jurkat, clone JK45.01, une lignée qui possède à la surface de la cellule un niveau d'expression basal de CD45 correspondant à 2-3% de l'expression normale du CD45 selon l'American Type Culture Collection (ATCC). En utilisant ce clone de cellules avec le TBT, un niveau de fragmentation internucléosomale de l'ADN identique à celui des cellules Jurkat normales a été induit. Les deux clones de cellules

CD45 négatives qui ont été utilisés dans notre étude sont totalement déficients pour l'expression de cette protéine. Ceci démontre que seulement un très faible niveau d'expression du CD45 n'est nécessaire pour promouvoir la fragmentation de l'ADN, et que l'activité du CD45 doit être totalement absente afin d'abolir ce phénomène. L'utilisation de cellules totalement déficientes pour l'expression du CD45 pourrait possiblement permettre de démontrer que le phénomène de résistance à l'induction d'apoptose nucléaire puisse s'appliquer à l'induction d'apoptose par la voie des récepteurs de mort mais des travaux ultérieurs devront être effectués afin de déterminer cette implication.

Un phénomène intrigant dans notre modèle d'apoptose est l'absence d'apoptose nucléaire chez les cellules CD45 négatives en dépit de l'activation de la caspase-3 et de l'activation de l'endonucléase DFF40/CAD au niveau du noyau. Il est généralement reconnu que l'activation de la caspase-3 consiste en un point de non-retour pour la cellule. Lorsque la caspase-3 est activée, elle opère et coordonne les changements morphologiques associés au processus de l'apoptose de façon irréversible. Très peu d'études font mention d'une absence d'apoptose nucléaire chez une population de cellules où il y a activation de la caspase-3. Outre les études où on a procédé à des manipulations génétiques où à l'inactivation des gènes codant pour l'expression des protéines impliqués dans le démantèlement du noyau comme le DFF40, la seule étude faisant état d'une résistance à l'apoptose nucléaire en présence de l'activation de la caspase-3 est celle de Kawamata *et al.* (1999). Ils ont démontré ceci chez des cellules Raji, lignée de cellules ayant le phénotype des lymphocytes B, en réponse à une variété de stimuli. Leur conclusion était que la résistance à l'apoptose nucléaire pouvait être relié à une défectuosité fonctionnelle ou structurelle du DFF40. Cette défectuosité pourrait n'être spécifique qu'au clone de cellule utilisé et ne peut être tenu responsable de la résistance à l'apoptose nucléaire en réponse au TBT. En effet, le complexe DFF45/DFF40 est retrouvé au niveau du noyau, contrairement à ce dont il est fait mention dans cet article, et il a été déterminé au cours de notre étude qu'un extrait cytoplasmique apoptotique provenant de cellules CD45 positives peut induire la fragmentation de l'ADN chez des noyaux isolés de cellules CD45 négatives. Le DFF40 est recruté au niveau des régions

internucléosomales afin de cliver l'ADN via son oligomérisation avec l'histone H1 mais le mécanisme est encore peu défini. Il a été démontré que la déphosphorylation de l'histone H1 par une phosphatase encore inconnue précède le clivage internucléosomal de l'ADN lors de l'induction d'apoptose (Kratzmeier *et al.*, 2000). Ceci pourrait suggérer que la phosphorylation de l'histone H1 procure un environnement stérique défavorable à l'oligomérisation de l'endonucléase. Ainsi, l'absence de déphosphorylation au niveau de l'histone H1 chez les cellules CD45 négatives pourrait empêcher le recrutement du DFF40 au niveau des régions internucléosomales et il serait intéressant d'adresser cette hypothèse lors de travaux ultérieurs.

D'autre part, il y a plusieurs facteurs qui agissent de façon complémentaire et redondante au cours du processus de dégradation nucléaire. Parmi ceux-ci, on note le facteur acinus, la lamine nucléaire et l'AIF qui contribuent à un certain niveau au processus de condensation de la chromatine ainsi que la L-DNase II et la cathepsine B dont l'activité est associée à la fragmentation de l'ADN. Le DFF40 est un facteur important impliqué dans la fragmentation internucléosomale de l'ADN. Chez des souris dont l'activité du DFF40 est absente, la fragmentation internucléosomale de l'ADN est totalement inhibée mais cependant, la condensation de la chromatine est encore détectée. Ainsi, bien que le DFF45 soit clivé et le DFF40 activé lors de l'induction d'apoptose par le TBT chez les cellules CD45 négatives, d'autres facteurs doivent être inhibés afin qu'il y ait absence totale d'apoptose nucléaire. À cet égard, il a été démontré que le complexe DFF45/DFF40 n'était pas requis pour la fragmentation de l'ADN en des fragments de haut poids moléculaires. Dans cette perspective, il serait intéressant de mieux analyser ce type de clivage initial de l'ADN qui ne peut être détecté avec les techniques de détection conventionnelles afin de déterminer si celui-ci est également affecté par l'absence du CD45. Le clivage de l'ADN en larges fragments de 2 Mpb coïncide avec l'adoption d'une morphologie arrondie du noyau qui pourrait ne pas être détectée par les études qui ont été effectuées par microscopie à fluorescence. De plus, il serait intéressant de déterminer la modulation des autres facteurs impliqués dans l'apoptose nucléaire activés par les caspases exécutrices, tels la lamine et acinus, chez les cellules CD45 négatives afin de

savoir si tout comme le DFF40, ceux-ci sont aussi activés chez les deux types de cellules et ne seraient pas responsables de la résistance qui est observée.

L'autre majeure différence observée chez les cellules CD45 négatives en réponse au TBT est le maintien de l'état de phosphorylation sur les résidus tyrosine à un niveau basal alors qu'il y a augmentation de cette phosphorylation chez les cellules CD45 positives. L'augmentation de la phosphorylation sur les résidus tyrosine témoigne d'une augmentation de l'activité de plusieurs tyrosine kinases à l'intérieur de la cellule. En bloquant cette activité lors de l'incubation avec le TBT, on abolit complètement le processus de fragmentation de l'ADN. Ainsi, l'intermédiaire se situant entre le CD45 et l'apparition d'apoptose nucléaire en réponse au TBT impliquerait des événements de signalisation médiés par les tyrosine kinases. Plusieurs études ont récemment démontrés que l'activité des caspases est modulée en partie par leur état de phosphorylation et celui de leurs substrats. Des évidences montrent que la phosphorylation des caspases peut inhiber leur activité et que la phosphorylation de certains substrats précède leur clivage par les caspases. Ces indications permettent d'avancer l'hypothèse que le ou les signaux défectifs localisés au niveau du cytoplasme chez les cellules CD45 négatives seraient reliés à l'activité des tyrosine kinases qui, en modifiant l'état de phosphorylation sur un substrat de la caspase-3, provoquerait le clivage par celle-ci d'un élément clé impliqué dans le démantèlement du noyau de la cellule.

Dans le cadre de ce projet de recherche, l'identité de cet ou de ces éléments n'a pas été découverte et devra faire l'objet de recherches futures. Cependant, ceux-ci sont probablement reliés à un certain niveau à l'activité du CD45. L'implication de trois composants de la voie d'activation des lymphocytes T, soit les tyrosines kinases p56<sup>lck</sup>, et ZAP-70 de même que la tyrosine phosphatase SHP-1, a été étudiée dans cette perspective mais les résultats ont démontrés que ceux-ci n'étaient pas essentiels au processus de fragmentation de l'ADN. Le CD45 est la protéine membranaire la plus exprimée chez les cellules hématopoïétiques et outre ses principaux substrats que sont les tyrosines kinases de la famille Src, p59<sup>lyn</sup> et p56<sup>lck</sup>, celui-ci est reconnu pour interagir avec des composantes de la voie de signalisation médiée par Ras, et avec des composantes du

cytosquelette et du récepteur des lymphocytes T. Il a été récemment démontré que l'exposition au TBT chez la lignée de cellules T lymphoblastiques CCRF-CEM engendre la phosphorylation calcium-dépendante de JNK, ERK et p38 MAPK (Yu *et al.*, 2000). Cette augmentation est observée après 15 minutes et est soutenue jusque 4 heures après l'exposition, sensiblement la même cinétique qui a été observée pour la phosphorylation sur les résidus tyrosine dans notre étude. Il est possible que la phosphorylation de ces éléments puisse être affectée chez les cellules CD45 négatives. Un fait intéressant est que les protéines de la voie des MAPK peuvent transmettre leur signaux directement à l'intérieur du noyau de la cellule et qu'elles peuvent induire la phosphorylation de l'histone H3 et H1 (Hagmann, 1999). Par ailleurs, il a été démontré dans quelques études que le niveau de phosphorylation sur les protéines JNK et ERK lors de l'induction d'apoptose pouvait influencer la mort cellulaire par apoptose avec ou sans fragmentation de l'ADN, mais sans toutefois faire le lien entre les protéines responsables de la dégradation nucléaire. L'activité de ces protéines kinases pourraient donc constituer un lien potentiel entre le CD45 et l'apoptose nucléaire, et leur modulation en réponse au TBT chez les cellules CD45 négatives devra faire l'objet d'études ultérieures afin de déterminer si elles peuvent être responsables du signal défectif chez ces cellules.

La présence d'ATP à l'intérieur de la cellule est essentielle au déroulement du programme de mort cellulaire. Comme il a déjà été mentionné, l'ATP est nécessaire à la réunion des éléments formant l'apoptosome, impliqué dans le clivage et l'activation de la caspase-9. Il a été démontré que la présence en trop faible quantité d'ATP à l'intérieur empêche l'activation des caspases et l'induction d'apoptose nucléaire. L'ATP est également important à un autre niveau lors de l'apoptose. Sa présence est nécessaire lors du processus de condensation de la chromatine. L'action du TBT au niveau de la mitochondrie engendre une déplétion des niveaux d'ATP à l'intérieur de la cellule. La caspase-3 est activée chez les cellules CD45 positives et négatives, ce qui témoigne de la présence suffisante d'ATP pour entraîner la formation de l'apoptosome. Cependant, comme la condensation de l'ADN se produit ultérieurement à l'activation de la caspase-3, la présence d'ATP généré par la cellule doit être encore suffisante à la fin de la réponse apoptotique pour amorcer le processus de condensation de la chromatine. Il est possible

que les niveaux d'ATP soient plus sévèrement réduits chez les cellules CD45 négatives en réponse au TBT et qu'ils ne puissent être suffisant pour permettre la condensation de la chromatine chez ces cellules.

L'absence de fragmentation de l'ADN et de la condensation de la chromatine ne préserve pas les cellules de la mort cellulaire. La fragmentation de l'ADN au niveau de régions internucléosomales est un événement tardif et non-nécessaire au processus de mort cellulaire. De plus, le degré de fragmentation est très variable selon le type de cellules. La condensation de la chromatine et la formation de corps apoptotiques a quant à elle pour rôle de favoriser l'élimination des cellules apoptotiques par les cellules phagocytaires. L'absence de ces phénomènes est généralement reconnu pour conférer à la cellule un profil de mort cellulaire par nécrose. En ce qui concerne notre modèle de mort cellulaire chez les cellules CD45 négatives, il pourrait être défini comme un processus d'apoptose, mais à morphologie nécrotique. D'une part, il y a un programme actif de suicide menant à l'activation des caspases et du DFF40 qui a été engagé. De l'autre part, le processus de mort cellulaire est caractérisé par une absence d'apoptose nucléaire et, selon des études préliminaires, par une absence d'exposition des résidus phosphatidylsérines à l'extérieur de la cellule. Les études effectuées dans le cadre de ce projet de recherche ont été effectuées *in vitro*, mais *in vivo* l'absence du CD45 chez les cellules du système immunitaire pourrait amener certaines perturbations physiologiques à la suite de l'induction d'apoptose chez ces cellules. L'absence de reconnaissance via les résidus phosphatidylsérine et l'absence de formation de corps apoptotiques n'entraînerait pas l'élimination de ces cellules endommagées par les macrophages. Ces cellules potentiellement dangereuses demeurant à l'intérieur de l'organisme pourraient ainsi être à l'origine de certaines réactions inflammatoires. Le CD45 pourrait donc avoir un rôle physiologique à jouer dans le bon déroulement du programme apoptotique. La perte de l'expression du CD45 chez une population de cellules ou l'inactivation de celui-ci pourrait détourner le processus d'élimination normale des cellules par apoptose vers un processus de mort par nécrose et ainsi être la cause de plusieurs affections physiologiques. Le contrôle de l'activité du CD45 pourrait être une approche thérapeutique potentielle dans le traitement de certaines maladies.

En conclusion, les travaux effectués dans le cadre de ce projet de recherche ont démontrés que la protéine tyrosine phosphatase CD45 est essentielle à l'induction d'apoptose nucléaire en réponse à des agents chimiques tels que le TBT et le peroxyde d'hydrogène. Ceci est la première étude à faire état d'un tel rôle pour le CD45 et ceci constitue une nouvelle voie de signalisation dans le processus d'apoptose. De plus, cette étude constitue l'une des seules études où il est démontré une absence d'apoptose nucléaire en dépit de l'activation de la caspase-3. Les travaux ont démontrés que l'absence du CD45 inhibe l'activation des tyrosines kinase par le TBT et que cette activation jouerait un rôle essentielle en aval de la caspase-3 contribuant à l'induction de l'apoptose nucléaire. Plusieurs travaux devront être effectués afin de mieux caractériser et de définir les éléments modulés par le CD45 et responsable de l'induction d'apoptose nucléaire, mais il ne fait aucun doute que cette nouvelle voie de signalisation au cours du processus d'induction d'apoptose chez les cellules du système immunitaire semble très prometteuse et pourrait faire l'objet d'intervention thérapeutique.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- ALDRIDGE, W. N. 1958. « The biochemistry of organotins compounds », Biochemical Journal, vol. 69, p. 367-376.
- ALDRIDGE, W. N. 1976. « The influence of organotins compounds on mitochondrial functions », Adv. Chem. Ser., vol. 157, p. 186-196.
- ALDRIDGE, W. N. et B. W. Street. 1964. « Oxidative phosphorylation: biochemical effects and properties of trialkyltins », Biochemical Journal, vol. 91, no. 2, p.287-297.
- ALZIEU, C., M. Héral, Y. Thibaud, M. J. Dardignac et M. Feuillet. 1982. « Influence des peintures antisalissures à base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huître *Crassostrea gigas* », Rev. Trav. Inst. Pêches Marit., vol. 45, p. 101.
- ARENDDT, 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 », The Journal of Biological Chemistry, vol. 272, no. 20, p. 13117-13125.
- ASCHER, K. R. S. 1985. « Nonconventional biocidal uses of organotins », Phytoparasitology, vol. 13, p. 153-154.
- AW, T.Y., P. Nicotera, L. Manzo et S. Orrenius. 1990. « Tributyltin stimulates apoptosis in rat thymocytes », Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 283, no. 1, p. 46-50.
- BARRETT, M., D. Xue, H. R. Horvitz et T. D. Gilmore. 1997. « Phosphorylation of IkappaB-alpha inhibits its cleavage by caspase CPP32 in vitro », Journal of Biological Chemistry, vol. 272, no. 47, p. 29419-29422.
- BARNES, J. M. et H.B. Stoner. 1958. «Toxic properties of some dialkyl and trialkyltin salts», British Journal of Medecine. Vol. 15, p. 15.
- BARRACH H. J. et D. Neubert. 1986. «The toxic effect of TBTO on limb differentiation in vitro», Teratology. Vol. 33, p. 63C.
- BLUNDEN, S. J., L. A. Hobbs et P. J. Smith. 1984 « The environmental chemistry of organotin compounds », In Environmental Chemistry, Royal. Soc. Chem., London, p. 46-77.
- BLUNDEN, S. J. et A. Chapman. 1986. « Organotins compounds in the environment », In Organometallic compounds in the environment—Principles and Reactions, Craig, P. J., Éd., Longman, London, p. 111.
- BOSSY-WETZEL, E. et D. R. Green. 1999. « Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors », Journal of Biological Chemistry, vol. 274, no. 25, p. 17484-17490.

BOUILLET, P., D. Metcalf, D. C. S. Huang, D. M. Tarlinton, T. W. H. Kay, F. Köntgen, J. M. Adams et A. Strasser. 1999. « Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leucocyte homeostasis and to preclude autoimmunity », Science, vol. 286, p. 1735-1738.

BOYER, I.J. 1989. « Toxicity of dibutyltins, tributyltin and other organotin compounds to human and experimental animals », Toxicology, vol. 55, no. 3, p. 253-298.

BRYAN, G. W., P. E. Gibbs, G. R. Burt, et L. G. Hummerstone. 1986. « The effects of tributyltin accumulation on adult dog-whelks *Nucella lapillus*, long-term field and laboratory experiments », J. Mar. Biol. Assoc. U. K., vol. 67, no. 3, p. 525-544.

BUTTERFIELD, D. A., A. M. Schneider et A. Rangachari. 1991. « Electron paramagnetic resonance studies of the effects of tri-*n*-butyltin on the physical state of proteins and lipids in erythrocyte membranes », Chemical Research in Toxicology, vol. 4, no. 2, p. 141-143.

BYON, J. C. H., K. A. Kenner, A. B. Kusari et J. Kusari. 1997. « Regulation of growth factor-induced signaling by protein-tyrosine-phosphatases », Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, vol. 216, no. 1, p. 1-20.

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, no. 4, p. 1707-1718.

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. 1318-1321.

CHIKAISA, L., and Y. Oyama. 1992. « Tri-*n*-butyltin increases intracellular Ca<sup>2+</sup> in mouse thymocytes: a flow cytometric study using fluorescent dyes for membrane potential and intracellular Ca<sup>2+</sup> », Pharmacology and Toxicology, vol. 71, no. 3, p. 190-195.

CHINNAIYAN, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari et V. M. Dixit. 1995. « FADD, a novel death domain-containing protein interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis », Cell, vol. 81, no. 4, p. 505-512.

CHOW, S. C., G. E. Kass, M. J. McCabe Jr. et S. Orrenius. 1992. « Tributyltin increases cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration in thymocytes by mobilizing intracellular Ca<sup>2+</sup>, activating a Ca<sup>2+</sup> entry pathway, and inhibiting Ca<sup>2+</sup> efflux », Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 298, no. 1, p. 143-149.

- CHOW, S. C. et S. Orrenius. 1994. « Rapid cytoskeleton modification in thymocytes induced by the immunotoxicant tributyltin », Toxicology and Applied Toxicology, vol. 127, no. 1, p. 19-26.
- COHEN, G. M. 1997. « Caspases : the executioners of apoptosis », Biochemical Journal, vol. 326, p. 1-16.
- COHEN, J. J., R. C. Duke, V. A. Fadok et K. S. Sellins. 1992. « Apoptosis and programmed cell death in immunity », Annual Review of Immunology, vol. 10, p. 267-293.
- CONUS, S., T. Kaufmann, I. Fellay, I. Otter, T. Rossé et C. Borner. 2000. « Bcl-2 is a monomeric protein : prevention of homodimerization by structural constraints », The EMBO Journal, vol. 19, no. 7, p. 1534-1544.
- COONEY, J. J., J. H. Weber et L. R. Sherman. 1994. « Tributyltins in aquatic ecosystems », In Biological diversity : problems and challenges, The Pennsylvania Academy of Science, Easton, Penna., p. 123-135.
- CORSINI, E., A. Bruccoleri, M. Marinovich et C. L. Galli. 1996a. « Endogenous Interleukin-1 $\alpha$  is associated with skin irritation induced by tributyltin », Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 138, no. 2, p. 268-274.
- CORSINI, E., C. Schubert, M. Marinovich et C.L. Galli. 1996b. « Role of mitochondria in tributyltin-induced interleukin-1 $\alpha$  production in murine keratinocytes », Journal of Investigative Dermatology, vol. 107, no. 5, p. 720-725.
- CORSINI, E., B. Viviani, M. Marinovich et C. L. Galli. 1997a. « Role of mitochondria and calcium ions in tributyltin-induced gene regulatory pathways », Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 145, no. 1, p. 74-81.
- CORSINI, E., A. Terzoli, A. Bruccoleri, M. Marinovich. et C. L. Galli. 1997b. « Induction of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  *In Vivo* by a skin irritant, Tributyltin, through activation of transcription factors : its pharmacological modulation by anti-inflammatory drugs », Journal of Investigative Dermatology, vol. 108, no. 6, p. 892-896.
- CUEVAS, B., Y. Lu, S. Watt, R. Kumar, J. Zhang, K. A. Siminovitch et G. B. Mills. 1999. « SHP-1 regulates Lck-induced phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation and activity », The Journal of Biological Chemistry, vol. 274, no. 39, p. 27583-27589.
- DAVIS, A. *et al.* 1987. «Evaluation of the genetics and embryotoxic effects of TBTO, a broad spectrum pesticide, in multiple in vivo and in vitro short terms tests». Mutat. Res. Vol. 188, p. 65.

DENIS, F., E. Rhéaume, S. M. Aouad, A. Alam, R. –P. Sékaly et L. Y. Cohen. 1998. « The role of caspases in T cell development and the control of immune responses », Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 54, no. 9, p. 1005-1019.

DESAI, D. M., J. Sap, J. Schlessinger et A. Weiss. 1993. « Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane tyrosine phosphatase », Cell, vol. 73, no. 3, p. 541-554.

DI SOMMA, M., S. Nuti, J. L. Telford, et C. T. Baldari. 1995. « p56lck plays a key role in transducing apoptotic signals in T cells », FEBS Letters, vol. 363, p. 101-104.

DU, C., M. Fang, Y. Li, L. Li et X. Wang. 2000. « Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependant caspase activation by eliminating IAP inhibition », Cell, vol. 102, no. 1, p. 33-42.

DUAN, H. et V. M. Dixit. 1997. « RAIDD, a novel death adaptor molecule », Nature, vol. 85, no. 6611, p. 86-89.

DUCHEN, M. R. 1999. « Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death », Journal of Physiology, vol. 516, p. 1-17.

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.

EISCHEN, C. M., C. J. Dick, et P. J. Leibson. 1994. « Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis », The Journal of Immunology, vol. 153, p. 1947-1954.

ELLIS, R. E., J. Yuan et H. R. Horvitz. 1991. « Mechanisms and functions of cell death », Annual Review of Cell Biology, vol. 7, p. 663-698.

ENARI, M., S. Sakahira, H. Yokohama, 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.

FADOK, V. A., J. S. Savill, C. Haslett, D. L. Bratton, D. E. Doherty, P. A. Campbell, et P. M. Henson. 1992. « Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells », Journal of Immunology, vol. 149, no. 12, p. 4029-4035.

FADOK, V. A., D. L. Bratton, D. M. Rose, A. Pearson, R. A. Ezekewitz, et P. M. Henderson. 2000. « A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells », Nature, vol. 405, p. 85-90.

FENT, K. 1996. « Ecotoxicology of Organotin Compounds ». Critical Reviews in Toxicology, vol. 26, no. 1, p. 1-117.

FISH, R. H., E. C. Kimmel et J. E. Casida. 1976. « Bioorganotin chemistry : reactions of tributyltin derivatives with a cytochrome P-450 dependent monooxygenase enzyme system », Journal of Organometallic Chemistry, vol. 118, p. 41.

FLADMARK, K. E., O. T. Brustugun, R. Hovland, R. Boe, B. T. Gjersten, B. Zhivotovsky et S. O. Doskeland. 1999. « Ultrarapid caspase-3 dependent apoptosis induction by serine/threonine phosphatase inhibitor », Cell Death and Differentiation, vol. 6, no. 11, p. 1099-1108.

FORSYTH, D. S. et C. Cleroux. 1991. « Determination of butyltin, methyltin and tetraalkyltin in marine food products with gas chromatography-atomic absorption spectrometry », Talanta, vol. 9, p. 951.

FUKURAMA, T., M. Itoh, N. X. Krueger, M. Streuli et H. Saito. 1994. « Specific interaction of the CD45 protein tyrosine phosphatase with tyrosine phosphorylated CD3 zeta-chain », Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 91, no. 23, p. 10928-10932.

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, no. 2, p. 259-266.

GERVAIS, F. G. et A. Veillette. 1997. « Reconstitution of interactions between protein-tyrosine phosphatase CD45 and tyrosine-protein kinase p56<sup>lck</sup> in nonlymphoid cells », The Journal of Biological Chemistry, vol. 272, no. 19, p. 12754-12761.

GHIBELLI, L., V. Maresca, S. Coppola et G. Gualandi. 1995. « Protease inhibitors blocks apoptosis at an intermediate stages : a compared analysis of DNA fragmentation and apoptotic nuclear morphology », FEBS Letters, vol. 377, p. 9-14.

GIBBS, P. E. et G. W. Bryan. 1986. « Reproductive failure in populations of the dogwhelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints », J. Mar. Biol. Assoc. U. K., vol. 66, p. 767.

GIBBS, P. E., P. L. Pascoe et G. R. Burt. 1988. « Sex change in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, induced by tributyltin from antifouling paints », J. Mar. Biol. Assoc. U. K., vol. 68, no. 4, p. 715-732.

GLUCKSMAN, A. 1951. « Cell deaths in normal vertebrate ontogeny », Biological Reviews, vol. 26, p. 5986.

GOLDSTEIN, J. C., N. J. Waterhouse, P. Juin, G. I. Evan, et D. R. Green. 2000. « The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant », Nature Cell Biology, vol. 2, no. 3, p. 156-162.

GOMEZ, J., A. Gonzalez, C. A. Martinez et A. Rebollo. 1998. « IL-2-induced cellular events », Critical Reviews in Immunology, vol. 18, no. 3, p. 185-220.

GONZALEZ-GARCIA, A., L. R. Borlado, E. Leonardo, I. Mérida, C. A. Martinez, et A. C. Carrera. 1997. « Lck is necessary and sufficient for Fas-ligand expression and apoptotic cell death in mature cycling T cells », The Journal of Immunology, vol. 158, p. 4104-4112.

GOPING, I. S., A. Gross, J. N. Lavoie, M. Nguyen, R. Jemmerson, K. Roth, S. J. Korsmeyer et G. C. Shore. 1998. « Regulated targeting of Bax to mitochondria », Journal of Cell Biology, vol. 143, no. 1, p. 207-215.

GREEN, D. R. et H. M. Beere. 2000. « Gone but not forgotten », Nature, vol. 405, p. 28-29.

GREEN, D. R. 2000. « Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors », Cell, vol. 102, no. 1, p. 1-4.

GRIFFITHS, G. J., L. Dubrez, C. P. Morgan, N. A. Jones, J. Whitehouse, B. M. Corfe, C. Dive et J. A. Hickman. 1999. « Cell damage-induced conformational changes of the proapoptotic protein Bak *in vivo* precede the onset of apoptosis », Journal of Cell Biology, vol. 144, no. 5, p. 903-914.

GUARD, H. E., A. B. Cobet et W. M. Coleman. 1981. « Methylations of trimethyltin compounds by estuarine sediments », Science, vol. 213, p. 770-772.

GRAY, B. H., M. Porzavnik, C. Flemming et L. H. Lee. 1987. « Tri-*n*-butyltin : a membrane toxicant », Toxicology, vol. 47, no. 1-2, p. 35-54.

HAGMANN, M. 1999. « How chromatin changes its shape », Science, vol. 285, p. 1200-1203.

HARADA, H., B. Becknell, M. Wilm, M. Mann, L. J. Huang, S. S. Taylor, J. D. Scott, et S. J. Korsmeyer. 1999. « Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A », Molecular Cell, vol. 3, no. 4, p. 413-422.

HEHNER, S. P., T. G. Hofmann, F. Ratter, W. Drodge et M. L. Schmitz. 1999. « Inhibition of tyrosine phosphatases antagonizes CD95-mediated apoptosis », European Journal of Biochemistry, vol. 264, no. 1, p. 132-139.

HENGARTER, 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, no.4, p. 665-676.

HIRSCH, T., S. A. Susin, I. Marzo, P. Marchetti, N. Zamzani et G. Kroemer. 1998. Cell Biology and Toxicology, vol. 42, no. 2, p. 141-145.

- HOVIS, R. R., J. A. Donovan, M. A. Musci, D. G. Motto, F. D. Goldman, S. E. Ross et G. A. Koretzki. 1993. « Rescue of signaling by a chimeric protein containing the cytoplasmic domain of CD45 », Science, vol. 260, p. 544-546.
- HSU, H., J. Xiong et D. V. Goeddel. 1995. « The TNF receptor1-associated protein TRADD signals cell death and NF- $\kappa$ B activation », Cell, vol. 81, no. 4, p. 495-504.
- HUGGETT, R. J., M. A. Unger, P. F. Seligman et A. O. Valkirs. 1992. « The marine biocide tributyltin : assessing and managing the environmental risks », Environmental Science and Technology, vol. 26, no. 2, p. 232-237.
- HUMPEL, M., G. Kuhne, U. Tauber et P. E. Schulze. 1986. « Studies on the kinetics of bis(tri-*n*-butyl-<sup>113</sup>tin) oxide (TBTO) ». In *Toxicology and Analytics of the Tributyltins—The Present Status*, ORTEP, Berlin, p. 122-142.
- ITOH, N. et S. Nagata. 1993. « A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen », The Journal of Biological Chemistry, vol. 268, no. 15, p. 10932-10937.
- JACOBSEN, M. D., M. Weil et M. C. Raff. 1997. « Programmed cell death in animal development », Cell, vol. 88, no. 3, p. 347-354.
- JARPE, M. L., C. Widmann, C. Knall, T. K. Schlesinger, S. Gibson, T. Yujiri, G. R. Fanger, E. W. Gelfand, et G. L. Johnson. 1998. « Anti-apoptotic versus pro-apoptotic signal transduction : checkpoints and stop signs along the road to death », Oncogene, vol. 17, p. 1475-1482.
- KANDEL, E. S. et N. Hay. 1998. « The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB », Experimental Cell Research, vol. 253, no. 1, p. 210-229.
- KAWAMATA, Y., M. Hirokawa, A. Kitabayashi, T. Horiuchi, J. Kuroki and et A.B. Miura. 1999. « Defective apoptotic signal transduction pathway downstream of caspase-3 in human B-lymphoma cells : a novel mechanism of nuclear apoptosis resistance ». Blood, vol. 94, no. 10, p. 3523-3530.
- KEITHLY, J. C., R. D. Cardwell et D. G. Henderson. 1999. « Tributyltin in seafood from Asia, Australia, Europe, and North America : Assessment of Human Health Risks », Human and Ecological Risk Assessment, vol. 5, no. 2, p. 337-354.
- KELEKAR, A. et C. B. Thompson. 1998. « Bcl-2 family proteins : the role of the BH3 domain in apoptosis », Trends in Cell Biology, vol. 8, no. 8, p. 324-330.
- KERR, J. F. R., 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, no. 4, p. 239-257.

KERR, J. F. R. et B. V. Harmon. 1991. « Definition and incidence of apoptosis : an historical perspective », In *Apoptosis, the Molecular Basis of Cell Death*, L. D. Tomei et F. O. Cope. (éd), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, p. 5-29.

KIMMEL, E. C., R. H. Fish et J. E. Casida. 1977. « Bioorganotin chemistry. Metabolism of organotin compounds in microsomal monooxygenase systems and in mammals », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 25, no. 1, p. 1-9.

KISCHKEL, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita et P. H. Krammer. 1995. « Cytotoxicity-dependant APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins from a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor », *The EMBO Journal*, vol. 14, no. 22, p. 5579-5588.

KISHIHARA, K., J. Penninger, V. A. Wallace, T. M. Kunding, K. Kawai, A. Wakeham, E. Timms, K. Pfeffer, P. S. Ohashi, M. L. Thomas, C. Furlonger, C. J. Paige et T. W. Mak. 1993. « Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice », *Cell*, vol. 74, no. 1, p. 143-156.

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. 2743-2753.

KRAJNC, E. I., P. W. Wester, J. G. Loeber, F. X. R. Van Leeuwen, J. G. Vos, H. A. M. G. Vaessen et C. A. Van der Heijden. 1984. « Toxicity of bis(tri-*n*-butyltin)oxide in the rat : I. Short-term effects on general parameters and on the endocrine and lymphoid systems », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 75, no. 3, p. 363-386.

KRATZMEIER, M., W. Albig, K. Hanecke et D. Doenecke. 2000. « Rapid dephosphorylation of H1 histones after apoptosis induction », *The Journal of Biological Chemistry*, vol.

KROEMER, G. 1997. « The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis », *Nature Medicine*, vol. 3, no. 6, p. 614-620.

KROEMER, G. et J. C. Reed. 2000. « Mitochondrial control of cell death », *Nature Medicine*, vol. 6, no. 5, p. 513-519.

KURE, L. K. et M. H. Depledge. 1994. « Accumulation of organotins in *Littorina littorea* and *Mya arenaria* from Danish coastal waters », *Environmental Pollution*, vol. 84, no. 2, p. 149-157.

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, no. 3, p. 871-875.

- LAUGHLIN, R. B. Jr. 1996. « Bioaccumulation of TBT by aquatic organisms », In *Organotin—environmental fate and effects*, M. A. Champ et P. F. Seligman, (éd.), Chapman and Hall, London, p. 331-355.
- LEE, J. M., M. Fournel, A. Veillette et P. E. Branton. 1996. « Association of CD45 with Lck and components of the Ras signalling pathway in pervanadate-treated mouse T-cell lines », *Oncogene*, vol. 12, no. 2, p. 253-263.
- LESAGE, S., A. M. Steff, F. Philippoussis, M. Pagé, S. Trop, V. Mateo et P. Hugo. 1997. « CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes are preferentially induced to die following CD45 cross-linking, through a novel apoptotic pathway ». *Journal of Immunology*, vol. 159, p. 4762-4771.
- LI, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, et X. Wang. 1997. « Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade ». *Cell*, vol. 91, p. 479-489.
- 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, no. 2, p. 175-184.
- LIU, X., P. Widlak, H. Zou, X. Luo, W. 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 Science of the United States of America*, vol. 95, no. 15, p. 8461-8466.
- 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 », *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 20, p. 13836-13840.
- LOKESHWAR, V. B. et Y. M. Bourguignon. 1992. « Tyrosine phosphatase activity of lymphoma CD45 (GP180) is regulated by a direct interaction with the cytoskeleton », *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 30, p. 21551-21557.
- MACINO, B., A. Zambon, G. Milan, A. Cabrelle, M. Ruzzene, A. Rosato, S. Mandruzzato, L. Quintieri, P. Zanovello et D. Collavo. 1996. « CD45 regulates apoptosis induced by extracellular adenosine triphosphate and cytotoxic T lymphocytes », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 226, no. 3, p. 769-776.
- MAGUIRE, R. J., J. H. Carey et E. J. Hale. 1983. « Degradation of tri-*n*-butyltin species in water », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 31, p. 1060.
- 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, no. 5347, p. 88-91.

MARINOVICH, M., B. Viviani, et C. L. Galli. 1990. « Reversibility of tributyltin-chloride-induced protein synthesis inhibition after ATP recovery in HEL-30 cells », Toxicology Letters, vol. 52, no. 3, p. 311-317.

MARTINOU, J. C., S. Desagher et B. Antonsson. 2000. « Cytochrome c release from mitochondria : all or nothing », Nature Cell Biology, vol. 3, no. 2, p. 41-43.

MARTINS, L. M., T. J. Kettle, S. H. Kaufmann et W. C. Earnshaw. 1998. « Phosphorylated forms of activated caspases are present in cytosol from HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis », Blood, vol. 92, no. 9, p. 3042-3049.

MCKENNEY, D. W., H. Onodera, L. Gorman, T. Mimura et D. M. Rothstein. 1995. « Distinct isoforms of the CD45 protein-tyrosine phosphatase differentially regulate interleukin 2 secretion and activation signal pathways involving Vav in T cells. », The Journal of Biological Chemistry, vol. 270, no. 42, p. 29949-29454.

MEDEMA, J. P., C. Scaffidi, F. C. Kischkel, A. Shevshenko, M. Mann et P. H. Krammer. 1997. « FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC) », The EMBO Journal, vol. 16, no. 10, p. 2794-2804.

MIURA, M., H. Zhu, R. Rotello, E. A. Hartwig et J. Yuan. 1993. « Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 $\beta$ -converting enzyme, a mammalian homologue of the *C. elegans* cell death gene *ced-3* », Cell, vol. 75, no. 4, p. 653-660.

MIZUHASHI, S., Ikegaya, Y. et N. Matsuki. 2000. « Cytotoxicity of TBT in rat hippocampal slice cultures ». Neuroscience Research. Vol. 38, no. 1, p. 35-42.

MIZUHASHI, S., Ikegaya, Y., Nishiyama, N. et N. Matsuki. 2000. « Cortical astrocytes exposed to TBT undergo morphological changes in vitro ». Japan Journal of Pharmacology. Vol. 84, no. 3, p. 339-346.

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 signalling », The Journal of Biological Chemistry, vol. 274, no. 3, p. 1407-1414.

MUCHMORE, S. W. *et al.* 1996. « X-ray and NMR structure of human Bcl-X<sub>L</sub>, an inhibitor of programmed cell death », Nature, vol. 381, p. 335-341.

MUSTELIN, T., S. Williams, P. Taylor, C. Couture, G. Zenner, P. Burn, J. D. Ashwell et A. Altman. 1995. « Regulation of the p70<sup>zaps</sup> tyrosine protein kinase in T cells by the CD45 phosphotyrosine phosphatase », European Journal of Immunology, vol. 25, no. 4, p. 942-946.

NICHOLSON, D. W. 1996. « ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis », Nature Biotechnology, vol. 14, no. 3, p. 297-301.

OEHLMANN, J., E. Stroben, C. Bettin et P. Fioroni. 1993. « Hormonal disorders and tributyltin-induced imposex in marine snails », In Twenty-seventh European Marine Biology Symposium, Aldrich, J. C. (ed.), JAPAGA, Dublin, p. 301.

O'REILLY, L. A. et A. Strasser. 1999. « Apoptosis and autoimmune disease », Inflammation Research, vol. 48, no. 1, p. 5-21.

ORTH, K., A. M. Chinnaiyan, M. Garg, C. J. Froelich et V. M. Dixit. 1996. « The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A », The Journal of Biological Chemistry, vol. 271, no. 28, p. 16443-16446.

OYAMA, Y., T. Ueha, et A. Hayashi. 1993. « Effect of tri-n-butyltin on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of rat cerebellar neurons », European Journal of Pharmacology, vol. 248, no. 1, p. 89-93.

PAO, L. I., W. D. Bedzyk, C. Persin et J. C. Cambier. 1997. « Molecular targets of CD45 in B cell antigen receptor signal transduction », Journal of Immunology, vol. 158, no. 3, p. 1116-1124.

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.736-739.

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 Medecine, vol. 185, no. 10, p. 1851-1858.

PIETERS, R. H. H., M. Bol et A. H. Penninks. 1994. « Immunotoxic organotins as possible model compounds in studying apoptosis and thymocyte differentiation », Toxicology, vol. 91, no. 2, p. 189-202.

PIETERS, R. H. H., M. Bol, T. Ariëns, P. Punt, W. Seinen, N. Bloksma et A. H. Penninks. 1994. « Selective inhibition of immature CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> thymocyte proliferation, but not differentiation, by the thymus atrophy-inducing compound di-n-butyltin dichloride », Immunology, vol. 81, no. 2, p. 261-267.

PINGEL, J. T. et M. L. Thomas. 1989. « Evidence that the leukocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation », Cell, vol. 58, no. 6, p. 1055-1065.

PINKEY, A. E., D. A. Wright, M. A. Jepson et D. W. Towle. 1989. « Effects of tributyltin compounds on ionic regulation and gill ATPase activity in estuarine fish », Comparative Biochemistry and Physiology C, vol. 92, no. 1, p. 125-129.

PORZAVNIK, M., B. H. Gray, D. Mattie, A. G. Jackson et R. E. Omlor. 1986. « The ultrastructural localization of tri-n-butyltin in human erythrocyte membranes during shape transformation leading to hemolysis », Laboratory Investigation, vol. 54, no. 2, p. 254-267.

RAFFRAY, M. et G.M. Cohen. 1991. « Bis(tri-*n*-butyltin) oxide induces programmed cell death (apoptosis) in immature rat thymocytes », Archives of Toxicology, vol. 65, no. 2, p. 135-139.

RAFFRAY, M., D. McCarthy, R.T. Snowden et G.M. Cohen. 1993a. « Apoptosis as a mechanism of tributyltin cytotoxicity to thymocytes : relationship of apoptotic markers to biochemical and cellular effects », Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 119, no. 1, p. 122-130.

RAFFRAY, M., et G. M. Cohen. 1993b. « Thymocyte apoptosis as a mechanism for tributyltin-induced thymic atrophy in vivo », Archives of Toxicology, vol. 67, no. 4, p. 231-236.

RAFFRAY, M. et G. M. Cohen. 1998. « Re : Organotin-induced apoptosis as observed in vitro is not relevant for induction of thymus atrophy at antiproliferative doses », Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 153, no. 1, p. 136-138.

READER, S., M. Marion et F. Denizeau. 1993. « Flow cytometric analysis of the effects of tri-*n*-butyltin chloride on cytosolic free calcium and thiol levels in isolated trout hepatocytes », Toxicology, vol. 80, no. 2-3, p. 117-129.

REED, J. C. 1997. « Double identity for proteins of the Bcl-2 family », Nature, vol. 387, no. 6635, p. 773-776.

SABBATINI, P. et F. McCormick. 1999. « Phosphoinositide 3-OH kinase (PI3K) and PKB/Akt delay the onset of p53-mediated, transcriptionally dependent apoptosis », The Journal of Biological Chemistry, vol. 274, no. 34, p. 24263-24269.

SAHARA, S., M. Aoto, Y. Eguchi, M. Imamoto, Y. Yoneda et Y. Tsujimoto. 1999. « Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation », Nature, vol. 410, no. 6749, p. 168-172.

SAKAHIRA, H., M. Enari et S. Nagata. 1998. « Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis », Nature, vol. 391, no. 6662, p. 96-98.

SAMEJIMA, K. et W. C. Earnshaw. 1998. « ICAD/DFP regulator of apoptotic nuclease is nuclear », Experimental Cell Research, vol. 243, no. 2, p. 453-459.

SCAFFIDI, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. –M. Debatin, P. H. Krammer et M. E. Peter. 1998. « Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways », The EMBO Journal, vol. 17, no. 6, p. 1675-1687.

SCHLOTTMANN, K. E., E. Gulbins, S. M. Lau, et K. M. Coggeshall. 1996. « Activation of src-family tyrosine kinases during Fas-induced apoptosis », Journal of Leukocyte Biology, vol. 60, p. 546-554.

SCHRAVEN, B., Y. Samstag, P. Altevogt et S. C. Meuer. 1990. « Association of CD2 and CD45 in human T lymphocytes », Nature, vol. 345, no. 6270, p. 71-74.

SCHRAVEN, B., A. Schirren, H. Kirchgessner, B. Siebert et S. C. Meuer. 1992. « Four CD45/p56<sup>lck</sup>- associated phosphoproteins (pp29-pp32) undergo alterations in human T cell activation », European Journal of Immunology, vol. 22, no. 7, p. 1857-1863.

SCHRAVEN, B. et M. E. Peter. 1995. « APO-1(CD95)-mediated apoptosis in jurkat cells does not involve src kinase or CD45 », FEBS Letters, vol. 368, p. 491-494.

SCHWEINFURTH, H. A. et P. Gunzel. 1987. « The tributyltins : mammalian toxicity and risk evaluations for humans », In *Oceans '87 : The Ocean "an international workplace"*, Proceedings of the International Organotin Symposium, p. 1421-1431.

SEINEN, W. et A. Penninks. 1979. « Immune suppression as a consequence of a selective cytotoxic activity of certain organometallic compounds on thymus and thymus-dependent lymphocytes » Annals of the New-York Academy of Science, vol. 320, p. 499-517.

SELIGMAN, P. F., A. O. Valkirs et R. F. Lee. 1986. « Degradation of tributyltin in San Diego Bay, California, waters », Environmental Science and Technology, vol. 20, no. 12, p. 1229-1235.

SELWYN, A., A. P. Dawson, M. Stockdale et N. Gains. 1970. « Chloride-hydroxide exchange across mitochondrial erythrocyte and artificial lipid membranes mediated by trialkyl- and triphenyltin compounds », European Journal of Biochemistry, vol. 14, no. 1, p. 120-126.

SHORT, J. W. et F. P. Thrower. 1986. « Accumulation of butyltins in muscle tissue of chinook salmon reared in seapens treated with tri-*n*-butyltin », Marine Pollution Bulletin, vol. 17, no. 12, p. 542-545.

SHORT, J. W. et F. P. Thrower. 1987. « Toxicity of tri-*n*-butyltin to chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, adapted to seawater », Aquaculture, vol. 61, no. 3-4, p. 193-200.

SHOUKRY, M. M. 1993. « Equilibrium study of tributyltin(IV) complexes with amino acids and related compounds », Bulletin de la Société Chimique de France, vol. 130, p. 117.

SIEGEL, R. M., D. A. Martin, F. Hornung, E. A. Dudley, L. Zheng et M. J. Lenardo. 2000. « Signalling through Fas (CD95, APO-1) and related death receptors », In *Signalling Networks and Cell Cycle Control : The Molecular Basis of Cancer and Other Diseases*, J. S. Gutkind (éd.), Humana Press Inc., Totowa, New-Jersey, p. 135-152.

SIMCHOWITZ, L., J. A. Textor, et S. K. Vogt. 1991. « Use of tributyltin to probe contribution of Cl(-)HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange to regulation of steady-state pHi in human neutrophils », American Journal of Physiology, vol. 261, no. 5, p. 906-915.

SLOAN-LANCASTER, J. et L. E. Samelson. 2000. « Proximal events in T-cell activation », In *Signalling Networks and Cell Cycle Control : The Molecular Basis of Cancer and Other Diseases*, J. S. Gutkind (éd.), Humana Press Inc., Totowa, New-Jersey, p. 99-110.

SMIALOWICZ, R. J., M. M. Riddle, R. R. Rogers, R. W. Luebke et C. B. Copeland. 1989. « Immunotoxicity of tributyltin oxide in rats exposed as adults or pre-weanlings », *Toxicology*, vol. 57, no. 1, p. 97-111.

SMIALOWICZ, R. J., M. M. Riddle, R. R. Rogers, R. W. Luebke, C. B. Copeland. et G. G. Ernst. 1990. « Immune alterations in rats following subacute exposure to tributyltin oxide », *Toxicology*, vol. 64, no. 2, p. 169-178.

SMITH, C. A., T. Farrah et R. G. Goodwin. 1994. « The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins : activation, costimulation and death », *Cell*, vol. 76, no. 6, p. 959-962.

SNOEIJ, N. J., P. M. Punt, A. H. Penninks et W. Seinen. 1986. « Effects of tri-*n*-butyltin chloride on energy metabolism, macromolecular synthesis, precursor uptake and cyclic AMP production in isolated rat thymocytes », *Biochimica and Biophysica Acta*, vol. 852, no. 2-3, p. 234-243.

SNOEIJ, N. J. 1987. « Triorganotins Compounds in Immunotoxicology and Biochemistry », Thèse de Doctorat, Université d'utrecht, Belgique.

SRINIVASULA, S.M., M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri, G. Litwack, et E. S. Alnemri. 1996. « Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases », *Proceedings of the National Acadademy of Science of the USA* », vol. 93, p. 14486-14491.

STENNICKE, H. R., J. M. Jürgensmeier, H. Shin, Q. Deveraux, B. B. Wolf, X. Yang, Q. Zhou, H. M. Ellerby, L. M. Ellerby, D. Bredesen, D. R. Green, J. C. Reed, C. J. Froelich et G. S. Salvesen. 1998. « Pro-caspase-3 is a major physiological target of caspase-8 », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 42, p. 27084-27090.

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, no. 3, p. 351-355.

STRIDH, H., S. Orrenius et M. B. Hampton. 1999a. « Caspase involvement in the induction of apoptosis by the environmental toxicants tributyltin and triphenyltin », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 156, no. 2, p. 141-146.

STRIDH, H., D. Gigliotti, S. Orrenius et I. Cotgreave. 1999b. « The role of calcium in pre- and postmitochondrial events in tributyltin-induced T-cell apoptosis », Biochemical Biophysical Research Communications, vol. 266, no. 2, p. 460-465.

STRIDH, H., E. Fava, B. Single, P. Nicotera, S. Orrenius et M. Leist. 1999c. « Tributyltin-induced apoptosis requires glycolytic adenosine triphosphate production », Chemical Research in Toxicology, vol. 12, no. 10, p. 874-882.

STROBEN, E., J. Oelmann et C. Bettin. 1991. « TBT-induced imposex and role of steroids in marine snails », In Proceedings ORTEP, Berlin, vol. 86, p. 68-81.

SULSTON, J. E., E. Schierenberg, J. G. White et N. Thompson. 1983. « The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans* », Developmental Biology, vol. 100, no. 1, p. 64-119.

SUSIN, S. A., H. K. Lorenzo, M. Zamzani, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, G. M. Penninger et G. Kroemer. 1999. « Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor », Nature, vol. 397, no. 6718, p. 441-446.

SYMONS, A., A. C. Willis et A. N. Barclay. 1999. « Domain organization of the extracellular region of CD45 », Protein Engineering, vol. 12, no. 10, p. 885-892.

TAKEDA, A., A. Maizel, K. Kitamura, T. Ohta et S. Kimura. 1994. « Molecular cloning of the CD45-associated 30-kDa protein », Journal of Biological Chemistry, vol. 269, no. 4, p. 2357-2360.

TANG, D., R. Gururajan et V. J. Kidd. 1998. « Phosphorylation of PITSLRE p110 isoforms accompanies their processing by caspases during Fas-mediated cell death », Journal of Biological Chemistry, vol. 273, no. 26., p. 16601-16607.

TARTAGLIA, L. A., T. M. Ayres, G. H. Wong et D. V. Goeddel. 1993. « A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death », Cell, vol 74, no. 5, p. 845-853.

THOMAS, M. L. et E. J. Brown. 1999. « Positive and negative regulation of Src-family membrane kinases by CD45 », Immunology Today, vol. 20, no. 9, p. 406-411.

THOMPSON, C. B. 1995. « Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease », Science, vol. 267, p. 1456-1462.

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, no. 3, p. 1201-1216.

- THORNBERRY, N. A., H. G. Bull, J. R. Calaycay, K. T. Chapman, A. D. Howard, M. J. Kostura *et al.* 1992. « A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes », Nature, vol. 356, p. 768-774.
- TORRIGLIA, A., E. Chaudun, Y. Courtois et M. F. Counis. 1998. « L-DNase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor », Molecular and Cellular Biology, vol. 18, p. 3612-3619.
- TRAUTH, B.C., A. M. Peters, C. Klas, S. Matzku, P. Moller, W. Falk, K. M. Debatin et P. H. Krammer. 1989. « Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis », Science, vol. 245, no. 4915, p. 301-305.
- TROWBRIDGE, I. S. et M. L. Thomas. 1994. « CD45 : an emerging role as a protein phosphatase required for lymphocyte activation and development », Annual Review of Immunology, vol. 12, p. 85-116.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1997. Toxicological Review : Tributyltin Oxide, Integrated Risk Information System, Washington D. C., Cas No. 56-35-9, p. 1-44.
- VAN LOVEREN, H., E. I. Krajnc, J. A. Rombout, F. A. Blommaert et J. G. Vos. 1990. « Effects of ozone, hexachlorobenzene, and bis(tri-*n*-butyltin)oxide on natural killer activity in the lung », Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 102, p. 21-33.
- VAUX, D. L., I. L. Weissman et S. K. Kim. 1992. « Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2 », Science, vol. 258, p. 1955-1957.
- VAUX, D. L. et A. Strasser. 1996. « The molecular biology of apoptosis », Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, vol. 93, p. 2239-2244.
- VEILLETTE, A., D. Soussou, S. Latour, D. Davidson et F. G. Gervais. 1999. « Interactions of CD45-associated protein with the antigen receptor signaling machinery in T-lymphocytes », The Journal of Biological Chemistry, vol. 274, no. 20, p. 14392-14399.
- VERHAGEN, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson et D. L. Vaux. 2000. « Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins », Cell, vol. 102, p. 43-53.
- VIRKKI, L. et M. Nikinmaa. 1993. « Tributyltin inhibition of adrenergically activated sodium/proton exchange in erythrocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) », Aquatic Toxicology, vol. 25, p. 139-149.

VIVIANI, B., A.D. Rossi, S.C. Chow et P. Nicotera. 1995. « Organotin compounds induce calcium overload and apoptosis in PC12 cells », Neurotoxicology, vol. 16, p. 19-26.

VOGT, C. 1842. « Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes Obstetricians*) », In Gassman, J. U. Solothurn, p. 130.

VOLAREVIC, S., C. M. Burns, J. J. Sussman et J. D. Ashwell. 1990. « Intimate association of Thy-1 and the T-cell antigen receptor with the CD45 tyrosine phosphatase », Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 87, no. 18, p. 7085-7089.

VOLAREVIC, S., B. B. Niklinska, C. M. Burns, C. H. June, A. M. Weissman et J. D. Ashwell. 1993. « Regulation of TCR signaling by CD45 lacking transmembrane and extracellular domains », Science, vol. 260, p. 541-543.

VOS, J. G., A. DeKlerk, E. I. Krajnc., W. Kruizinga, B. Van Ommen et J. Rozing. 1984. « Toxicity of bis(tri-*n*-butyltin)oxide in the rat. II. Suppression of thymus-dependent immune responses and of parameters of nonspecific resistance after short-term exposure », Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 75, p. 387-408.

VOS, J.G., E.I. Krajnc et V.W. Wester. 1985. « Immunotoxicity of bis(tri-*n*-butyltin) oxide ». In Immunotoxicology and Immunopharmacology, J. Dean *et al.*, (éd.), Raven, New-York, p. 327-340.

VOS, J. G., A. DeKlerk, E. I. Krajnc, V. Van Loveren et J. Rozing. 1990. « Immunotoxicity of bis(tri-*n*-butyltin)oxide in the rat : effects on thymus-dependent immunity and on nonspecific resistance following long-term exposure in young versus aged rats », Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 105, p. 144-155.

WALDOCK, M. J. et J. E. Thain. 1983. « Shell thickening in *Crassostrea gigas* : organotin antifouling or sediment induced ? », Marine Pollution Bulletin, vol. 14, p. 411-415.

WALKER, P. R., S. Pandey et M. Sikorska. 1995. « Degradation of chromatin in apoptosis », Cell Death and Differentiation, vol. 2, p. 97-104.

WALKER, P. R. et M. Sikorska. 1997. « New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis », Biochemistry and Cell Biology, vol. 75, no. 4, p. 287-299.

WHO. 1980. « Tin and Organotins Compounds », World Health Organization, Genève, p. 109.

WHO. 1990. « Tributyltin compounds », World Health Organization, Genève, p. 273.

- WIDMANN, C., S. Gibson et G. L. Johnson. 1998. « Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis », The Journal of Biological Chemistry, vol. 273, no. 12, p. 7141-7147.
- WIDMANN, C., P. Gerwins, N. L. Johnson, M. B. Jarpe et G. L. Johnson. 1998. « MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis », Molecular and Cellular Biology, vol. 18, no. 4, p. 2416-2429.
- YALLAPRAGADA, P. R., Vig, P. J., Kodavanti, P. R. et D. Desai. 1991. « In vivo effects of triorganotin compounds on calmodulin activity in rat brain ». Journal of Toxicology and Environmental Health, Vol. 34, no. 2, p. 229-237.
- YANG, Y., S. Fang, J. P. Jensen, A. M. Weissman et J. D. Ashwell. 2000. « Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli », Science, vol. 288, p. 874-877.
- YU, Z. P., M. Matsuoka, B. Wispriyono, Y. Iryo et H. Igisu. 2000. « Activation of mitogen-activated protein kinases by tributyltin in CCRF-CEM cells : role of intracellular Ca(2+) », Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 168, no. 3, p. 200-207.
- ZAMZANI, N. et G. Kroemer. 1999. « Condensed matter in cell death », Nature, vol. 240, p. 127-128.
- ZAUCKE, F., H. Zöltzer et H.F. Krug. 1998. « Dose-dependent induction of apoptosis or necrosis in human cells by organotin compounds », Fresenius Journal of Analytical Chemistry, vol. 361, p. 386-392.
- ZHANG, J., X. Liu, D. C. Schere, 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 Science of the United States of America, vol. 95, no. 21, p. 12480-12485.
- ZOU, H., W. Henzel, X. Liu, A. Lutschg et X. Wang. 1997. « Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 », Cell, vol. 90, p. 405-413.
- ZUCKER, R. M., K. H. Elstein, R. E. Easterling, H. P. Ting-Beall, J. W. Allis et E. J. Massaro. 1988. « Effects of tributyltin on biomembranes : Alteration of flow cytometric parameters in inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase two-dimensional crystallization », Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 96, p. 393-403.

